

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

CARMEN CASTARDELI

**EFEITO DO DIMINAZENO, UM ATIVADOR DA ECA-2, NO REMODELAMENTO
CARDÍACO DE RATOS SUBMETIDOS AO INFARTO DO MIOCÁRDIO**

VITÓRIA
2016

CARMEN CASTARDELI

**EFEITO DO DIMINAZENO, UM ATIVADOR DA ECA-2, NO REMODELAMENTO
CARDÍACO DE RATOS SUBMETIDOS AO INFARTO DO MIOCÁRDIO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Mill

VITÓRIA
2016

Castardeli, Carmen.

Efeito do diminazeno, um ativador da ECA-2, no remodelamento cardíaco de ratos submetidos ao infarto do miocárdio / Carmen Castardeli. - 2016

78 f.

Orientador: José Geraldo Mill

Dissertação (mestrado)- Universidade Federal do Espírito Santo, Ciências fisiológicas.



**Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Universidade Federal do Espírito Santo
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**

Parecer Final da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado

A mestranda **Carmen Castardeli**, sob orientação do Prof. Dr. José Geraldo Mill, encaminhou a dissertação de mestrado intitulada **“EFEITO DO DIMINAZENO, UM ATIVADOR DA ECA-2, NO REMODELAMENTO CARDÍACO DE RATOS SUBMETIDOS AO INFARTO DO MIOCÁRDIO”** à Comissão Julgadora composta pelo examinador externo Prof. Dr. André Soares Leopoldo e o examinador interno Prof. Dr. Marcelo Perim Baldo. A Dissertação de Mestrado foi cuidadosamente analisada e cada avaliador emitiu um parecer sobre o trabalho executado pela candidata. A candidata, com a concordância de seu orientador, acatou todas as alterações propostas pelos avaliadores, reapresentando uma nova versão da Dissertação de Mestrado. Diante do exposto acima, a Comissão Julgadora considera a candidata aprovada e, portanto, fazendo jus à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Vitória – ES, 15 de Setembro de 2016

Prof. Dr. MARCELO PERIM BALDO
Presidente da Comissão Julgadora - Programa
de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Profa. Dra. ALESSANDRA SIMÃO PADILHA
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais que sempre me apoiaram em todas as decisões e me deram suporte para eu alcançar todos os meus objetivos. Em especial ao meu pai que é a pessoa na qual eu me espelho muito e sempre me orientou. A minha mãe que me acompanhou nessa jornada me dando apoio com palavras e acreditando que sou capaz.

Ao meu irmão que me levou na UFES alguns finais de semana e que foi me buscar varias vezes de madrugada.

A minha tia Nadir (segunda mãe) que mesmo distante foi capaz de me dar apoio com palavras reconfortante, torce por mim e acreditar que sou capaz.

Ao meu namorado que me acompanhou no decorrer do mestrado, indo comigo tratar dos animais, me ajudou no inglês, nos gráficos, me dando suporte com as palavras, além de ser um bom ouvinte nas horas que precisava reclamar.

Ao meu orientador, Professor Dr. José Geraldo Mill, por seu apoio, competência e especial atenção nas revisões e sugestões, fatores fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Durante esses dois anos e meio só tenho a agradecer a todos que passaram pelo meu caminho e que com certeza me ajudaram e me apoiaram muito em todos os momentos.

Agradeço ao Enildo Broetto que infartou todos meus ratos, me ensinou a fazer a hemodinâmica e me ajudou em todas as etapas experimentais.

A Ludmila Forechi por sempre estar disposta a ajudar e me ensinar a mexer em vários programas e a fotografar na histologia.

A Rafaela Aires, Layla Mendonça, Carolina Ximenes, Laís Salles pela amizade que me ajudaram a dividir os problemas e somar as alegrias.

Com certeza sem a ajuda e o apoio de todos eu não teria conseguido alcançar meu objetivo,

OBRIGADA, POR TUDO.

RESUMO

O Aceturato de Diminazeno (DIZE) é utilizado como medicamento anti-trypanosomal de uso veterinário que é capaz de aumentar a velocidade catalítica da enzima conversora de angiotensina-2 (ECA-2). Portanto, o objetivo do nosso trabalho foi investigar os efeitos do tratamento com DIZE no remodelamento cardíaco após infarto agudo do miocárdio (IAM). Além disso, a proposta foi comparar os dados do tratamento com DIZE com modelo experimental tratado com Losartan (Los). Ratos *Wistar* Macho foram submetidos ao procedimento cirúrgico de oclusão permanente da artéria coronária esquerda para produzir IAM, os animais controles foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a oclusão arterial. Após a cirurgia os animais foram distribuídos em cinco grupos: (1) Ratos Controles + Placebo (Con-Pla; n= 8); (2) Ratos Controles + DIZE (Con-DIZE; n= 6); (3) Ratos Infartados + Placebo (IM-Pla; n= 7); (4) Ratos Infartados + DIZE (IM-DIZE; n= 6); (5) Ratos Infartados + Losartan (IM-Los; n= 7), foram administrados diariamente injeção subcutânea de 15 mg/kg (DIZE e/ou Los) e placebo (NaCl 0.9%), durante 28 dias. Após 28 dias os animais foram anestesiados para obter as variáveis hemodinâmicas intracardíaca. Após registro hemodinâmico o coração foi parado em diástole com uma injeção intravenosa de KCl (1M). Um cateter de duplo lúmen foi inserido dentro da cavidade do ventrículo esquerdo (VE) para obter os dados da curva pressão volume. Os Corações foram fixados em paraformol e processados para análise histológica de hipertrofia dos miócitos e conteúdo de colágeno. O grupo IM-Pla apresentou aumento significativo da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo ($26 \pm 3,3$ mmHg) e redução na $dp/dt+$ (3014 ± 161 mmHg/s) e $dpdt-$ (-2333 ± 91 mmHg/s) e pressão sistólica do VE ($101 \pm 3,1$ mmHg), quando comparados com os grupos tratados com DIZE (PDFVE: $15 \pm 1,6$ mmHg/s; $dp/dt+$: 3884 ± 104 mmHg/s; $dpdt-$: -2798 ± 120 e PSVE: $110 \pm 0,7$ mmHg) e IM-Los (PDFVE: $16 \pm 2,9$; $dp/dt+$: 4146 ± 131 mmHg/s; $dpdt-$: -2823 ± 136 mmHg/s e PSVE: $111 \pm 3,5$ mmHg). A hemodinâmica do ventrículo direito (VD) mostrou aumento de pressão do VD no grupo IM-Pla ($40 \pm 0,6$ mmHg) e redução da pressão no grupo IM-DIZE (37 ± 2 mmHg). Os grupos de IM-DIZE ($0,33 \pm 0,03$ mmHg/mL e $0,64 \pm 0,01$ mmHg/mL) e IM-Los ($0,36 \pm 0,03$ mmHg/mL e $0,65 \pm 0,04$ mmHg/mL) apresentaram menor dilatação e rigidez no ventrículo esquerdo, quando comparados com o grupo infartados sobre Pla ($0,39 \pm 0,03$ mmHg/mL e $0,78 \pm 0,02$ mmHg/mL). O aumento da fração volumétrica de colágeno no VE foi parcialmente prevenido pelo tratamento com DIZE ou Los. A hipertrofia dos miócitos pós-infarto permaneceu inalterado pelo tratamento com DIZE. Como esperado o tratamento com losartan atenuou o crescimento hipertrófico no

ventriculo esquerdo quando comparado aos grupos controles. Em conclusão, nosso estudo apresentou que o DIZE foi parcialmente eficaz para prevenção de mudanças hemodinâmicas induzidas por infarto em ratos semelhante à observação em ratos infartados tratados com Los. As duas drogas também previnem o aumento da deposição de colágeno no miocárdio do ventrículo esquerdo. Em relação a hipertrofia dos miocitos, porém, apenas Los apresentou um efeito preventivo.

Palavras Chaves

Infarto do miocárdio, ECA-2, Diminazeno, Losartan, Insuficiência Cardíaca

ABSTRACT

Diminazene aceturate (DIZE) is used with an antitrypanosomal action for veterinary use which is also able to increase the catalytic efficiency of ACE-2. Thus the objective of our work was to investigate the effects of DIZE on the postinfarction cardiac remodeling process. Besides that, data with DIZE treatment were compared to those obtained in the same experimental model submitted to Losartan (Los). Rats Male *Wistar* were submitted to a surgical procedure to produce permanent occlusion of the left coronary artery to produce MI, the control animals underwent the same surgical procedure but without arterial occlusion. After surgery the animals were divided into five groups: (1) Control Rats + Placebo (Pla-Con, n = 8); (2) Controls Rats + DIZE (Con-DIZE; n = 6); (3) Infarcted Rats + Placebo (Pla-IM, n = 7); (4) Infarcted Rats + DIZE (IM-SAY; n = 6); (5) Infarcted Rats + Losartan (MI-Los; n = 7) were administered daily subcutaneous injection of 15 mg / kg (DIZE and / or LOS) and Placebo (0.9% NaCl) for 28 days. After 28 days the animals were anesthetized to record the intracardiac hemodynamic variables. After recording hemodynamic variables, the cardiac beats were stopped diastole with an intravenous injection of KCl (1 M). A double lumen catheter was inserted into the left ventricular cavity to obtain the record of the pressure-volume curve. Hearts were fixed in formalin and processed to histological analysis of myocyte hypertrophy and collagen content. The group IM-Pla presented a significant increase in the left ventricular end diastolic pressure (LVEDP = $26 \pm 3,3$ mmHg) and also a significant reduction of +dP/dt (3014 ± 161 mmHg/s), -dP/dt (-2333 ± 91 mmHg/s) and systolic blood pressure (SBP = 101 ± 3 mmHg), as compared with the groups treated with DIZE (LVEDP = $15 \pm 1,6$ mmHg/s; +dP/dt 3884 ± 104 mmHg/s; -dPdt = -2798 ± 120 mmHg/s and SVE = $110 \pm 0,7$ mmHg) or Los (LVEDP = $16 \pm 2,9$ mmHg; +dP/dt: 4146 ± 131 mmHg/s; -dPdt = -2823 ± 136 mmHg/s; SBP = $111 \pm 3,5$ mmHg). The right ventricle hemodynamic revealed an increase in systolic pressure in the IM-Pla group ($40 \pm 0,6$ mmHg) with a small decrease in the IM group under DIZE (37 ± 2 mmHg). The IM-DIZE ($0,33 \pm 0,03$ mmHg/mL e $0,64 \pm 0,01$ mmHg/mL) and IM-Los ($0,36 \pm 0,03$ mmHg/mL e $0,65 \pm 0,04$ mmHg/mL) groups showed less left ventricular dilatation and stiffness as compared with the infarcted group under Pla ($0,39 \pm 0,03$ mmHg/mL e $0,78 \pm 0,02$ mmHg/mL). The volumetric fraction of collagen in the surviving left ventricular myocardium increased, was partially prevented by DIZE or Los treatment. The postinfarction hypertrophy of cardiomyocytes, however, remained unaffected by DIZE treatment. As expected, treatment with losartan attenuated the hypertrophic growth in the left ventricle. In conclusion, our study showed that DIZE was effective to partially prevent the

hemodynamic changes induced by infarction in rats similarly to the observation in infarcted rats treated with Los. The two drugs also prevented the increase in the collagen deposition in the surviving left ventricular myocardium. In relation to the hypertrophic of cardiomyocytes, however, only Los showed a preventive effect.

Key words

Myocardial infarction, ACE-2, Diminazene, Losartan, Heart failure

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Ativação da renina não proteolítica e proteolítica.
- Figura 2.** Componentes do SRAA
- Figura 3.** Desenvolvimento do infarto do miocárdio
- Figura 4.** Remodelamento Ventricular após IAM
- Figura 5.** Representação molecular da ECA-2
- Figura 6.** Etapas da técnica de infarto.
- Figura 7.** Cateterismo da veia jugular externa direita e artéria carótida comum direita.
- Figura 8.** Figura representativa de uma onda de pressão intraventricular
- Figura 9.** Representação da preparação para obtenção da curva pressão-volume.
- Figura 10.** Esquema da preparação dos corações para histologia
- Figura 11.** Curva de Kaplan-Meier para a mortalidade dos ratos
- Figura 12.** Representação da área da infartada
- Figura 13.** Função hemodinâmica por cateterismo do ventrículo esquerdo
- Figura 14.** Hemodinâmica por cateterismo do ventrículo direito
- Figura 15.** Hemodinâmica do VD no cateterismo,
- Figura 16, 17, 18.** Curvas pressão volume
- Figura 19.** Avaliação da área ocupada por colágeno no miocárdio remanescente ao infarto após coloração com picrosirius red.
- Figura 20.** Avaliação da hipertrofia cardíaca pela medida da área de secção transversa do miócito em lâminas coradas com hematoxilina e eosina.

LISTA DE TABELAS

Tabela1. Parâmetros ponderais avaliados vinte e oito dias após a cirurgia

Tabela 2. Parâmetros ponderais entre os três grupos infartados avaliados vinte e oito dias após a cirurgia.

Tabela 3. Dados hemodinâmicos da artéria carótida

Tabela 4. Dados hemodinâmicos da artéria carótida dos três grupos infartados

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ang I: Angiotensina I

Ang II: Angiotensina II

Ang III: Angiotensina III

Ang IV: Angiotensina IV

Ang 1-7: Angiotensina 1-7

Ang 1-9: Angiotensina 1-9

AIF: Fator Indutor de Apoptose

ATP: Adenosina Trifosfato

Bax: Proteína com Ação Pró-Apoptótica

Bcl-2: Proteína com Ação Anti-Apoptótica

CTGF: Fator de Crescimento de Tecido Conjuntivo

CAT: Catalase

Con-DIZE: Controle-DIZE

Con-Pla: Controle-Placebo

DIZE: Aceturato de Diminazeno

DC: Débito Cardíaco

dp/dt+: derivada máxima positiva

dp/dt-: derivada máxima negativa.

ECA: Enzima Conversora de Angiotensina

ECA 2: Enzima Conversora de Angiotensina 2

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

FDA: Food Drug Administration

FC: Frequência Cardíaca

GPx: Glutathione Peroxidase

IL-6: Interleucina-6

IL-1 β : Interleucina-1 β

ICAM-1: Moléculas de Adesão Intercelular

IC: Insuficiência Cardíaca

IAM: Infarto Agudo do Miocárdio

IM-DIZE: Infartados-DIZE

IM-Los: Infartados-losartan

IM-Pla- Infartados-Placebo

MMP: Metaloproteinases

Na-K ATPase: Bomba de Sódio

NO: Óxido Nítrico

O²⁻ : Ânion Superóxido

PAI-1: Plasminogênio-1

NEP- Endopeptidases Neutra

PEP: Prolilendopeptidase

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

PSVE: Pressão Sistólica do Ventrículo Esquerdo

PDFVE: Pressão Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo

PAS: Pressão Arterial Sistólica

PAD: Pressão Arterial Diastólica

PDF: Pressão Diastólica Final

PC: Peso Corporal

R-AT1: Receptor AT1

R-AT2: Receptor AT2

IRAP: Receptores de Aminopeptidases Regulados pela Insulina

RER: (pró)renina

SRAA: Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

SOD: Superóxido Dismutase

TGF- β : Fator de Crescimento Tumoral β

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral α

TLR's: Toll Like Receptors

TIMP: Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase

VE: Ventrículo Esquerdo

VD: Ventrículo Direito

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona	18
1.2	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona Circulante	18
1.3	Os sistemas renina-angiotensina aldosterona locais	20
1.4	Infarto agudo do miocárdio (IAM)	22
1.5	Remodelamento da matriz extracelular	24
1.6	Ativação Neurohumoral no Curso do Remodelamento Ventricular	26
1.7	Remodelamento Cardíaca e Ativação do Sistema Renina Angiotensina	28
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivo Geral	32
2.2	Objetivos Específicos	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1	Animais e grupos experimentais	33
3.2	Técnica do infarto do miocárdio	33
3.3	Hemodinâmica central (ventrículos direito e esquerdo)	34
3.4	Análise <i>in situ</i> da Dilatação do Ventrículo Esquerdo: Relação Pressão-Volume	37
3.5	Histologia	38
3.6	Quantificação do colágeno	39
3.7	Análise do tamanho da área de infarto	40
3.8	Análise da Hipertrofia	40
3.9	Análise estatística	41
4	RESULTADOS	42
4.1	Avaliação da Mortalidade	42
4.2	Avaliação da área do infarto	42
4.3	Parâmetros Morfométricos	43
4.4	Medidas Hemodinâmicas - Ventrículo Esquerdo	45
4.5	Medidas Hemodinâmicas - Ventrículo Direito	48
4.6	Curva Pressão Volume	50
4.7	Colágeno	54
4.8	Hipertrofia	54
5	DISCUSSÃO	56
5.1	Avaliação da mortalidade	56

5.2	Parâmetros Morfométricos	57
5.3	Medidas Hemodinâmicas- Ventrículo Esquerdo	59
5.4	Medidas Hemodinâmicas- Ventrículo Direito	61
5.5	Curva Pressão Volume	62
5.6	Colágeno	64
5.7	Hipertrofia	65
5.8	Efeitos tóxicos	66
6	CONCLUSÕES	67
7	REFERÊNCIAS	68

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) participa da regulação de diferentes funções no organismo relacionadas, principalmente, ao equilíbrio hidroeletrolítico e pressão arterial. (Oudit et al., 2003; Carey & Siragy, 2003). Em seres humanos e outros animais existem dois tipos diferentes desse sistema: o SRAA clássico ou circulante que, na verdade, é um dos componentes do sistema endócrino, e vários SRAA locais identificados mais recentemente em vários órgãos e tecidos (coração, rins, vasos sanguíneos e sistema nervoso) e que parece desempenhar papel de regulação parácrina nestes mesmos órgãos e sistemas (Danser et al., 1994; Paul et al., 2006., Fyhrquist & Saijonmaa, 2008).

1.2 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona Circulante

No SRAA circulante, o angiotensinogênio é produzido principalmente no fígado, cuja síntese é fisiologicamente estimulada pelos hormônios glicocorticóides (secretados pelo córtex adrenal) e estrógenos (secretados pelas gônadas) (Fyhrquist & Saijonmaa, 2008). O SRAA circulatório é ativado em várias situações patológicas, como na hipotensão arterial, insuficiência cardíaca (IC), restrição de sódio, contração de compartimento intravascular (desidratação, hemorragia, diarreia), aumento do tônus simpático e inflamação (Wood et al., 2003). Além do fígado, o angiotensinogênio também é produzido nos SRAA locais só que em baixas quantidades quando comparado com a produção hepática.

No plasma o angiotensinogênio é clivado em angiotensina I (Ang I) pela renina, que é sintetizada e secretada pelo aparelho justaglomerular renal a partir da pró-renina (Atlas, 1998). A pró-renina não é ativa, pois a estrutura da sua cadeia de aminoácidos se encontra fechada, impedindo deste modo a clivagem do angiotensinogênio. Nos rins, a pró-renina é convertida em renina através da quebra enzimática na sequência de aminoácidos que enclausuram o sítio ativo da enzima (Nguyen & Danser, 2008).

A Ang I, por sua vez, é clivada pela enzima conversora de angiotensina (ECA) localizada no endotélio vascular e no plasma, formando a Angiotensina II (Ang II), a qual exerce seus efeitos através de ligação com dois tipos de receptores presentes nas membranas celulares: o

receptor AT1 (R-AT1) e o receptor AT2 (R-AT2). O R-AT2 é prevalente em tecidos embrionários e é pouco expresso em seres humanos na fase adulta. Porém, quando a Ang II se liga a ele, causa efeitos opostos àqueles produzidos pela ligação da Ang II ao R-AT1, o qual é bem mais abundante nas membranas celulares. A ativação do R-AT1 ativa uma cascata intracelular que leva à vasoconstrição, apoptose, liberação de aldosterona (retenção de Na^+ e H_2O e eliminação de K^+), disfunção endotelial, proliferação/hipertrofia de cardiomiócitos, fibrose, arritmia, estimulação simpática e trombose. Tais efeitos são opostos àqueles produzidos pela Ang II na ligação ao R-AT2, no qual promove um efeito cardioprotetor. (Carey et al., 2003; Chung et al., 1998; Dostal & Baker, 1999)

Entretanto, com a exploração do SRAA, verificou-se que ele é bem mais complexo do que considerado inicialmente. Atualmente a literatura relata que a Ang II pode seguir uma via alternativa e independente da ECA, formando outros peptídeos biologicamente ativos, como a Angiotensina III (Ang III), A Angiotensina IV (Ang IV) e Angiotensina 1-7 (Ang 1-7). A Ang III é produzida a partir da Ang II através da aminopeptidase A e possui ações muito semelhantes às da Ang II, via receptores AT1 e AT2 ((Donoghue et al., 2000., Crackower et al., 2002; Danilczyk & Penninger, 2006). A Ang IV pode ser gerada a partir da Ang III através da aminopeptidase M. Esse peptídeo biologicamente ativo tem despertado grande interesse após a descoberta dos receptores de aminopeptidases regulados pela insulina (IRAP) que são um sítio de ligação e um provável receptor (AT4) da Ang IV. As ações da Ang IV mediadas pelo IRAP incluem vasodilatação renal; aumento da expressão do inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), da interleucina-6 (IL-6), das moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e do fator de necrose tumoral $\alpha 13$ (Donoghue et al., 2000).

A enzima conversora de angiotensina-2 (ECA 2) também é importante no SRAA, pois atua na regulação da função cardíaca e renal (Crackower et al., 2002; Danilczyk & Penninger, 2006). Ela remove um único resíduo (Leu) da Ang I para gerar Ang-(1-9), um peptídeo com funções ainda desconhecidas que, por sua vez, pode ser clivado pela ECA ou pela endopeptidase neutra (NEP) para formar a Ang 1-7 (Brosnihan et al., 1998; Tschope et al., 2002; Donoghue et al., 2000). Esta enzima também degrada Ang II formando Ang 1-7, que também pode ser sintetizada por endopeptidases neutra e prolilendopeptidase (NEP e PEP) (Coates, 2003).

A Ang 1-7, ligando-se ao receptor Mas, que é um receptor acoplado à proteína G capaz de ativar cascatas intracelulares que se opõem aos efeitos da Ang II induzindo produção de óxido nítrico (NO) e vasodilatação. Além disso, inibe a ativação de ERK1/2 produzindo efeito angiogênico, antiproliferativo e antitrombótico sendo cardioprotetor na isquemia cardíaca e IC. Além disso, existem evidências de que a Ang-(1-7) interage com cininas e promove um

aumento da resposta vasodilatadora induzida pela bradicinina, evidenciando a importância deste peptídeo no controle do tônus vascular (Brosnihan et al., 1998; Tschope et al., 2002; Donoghue et al., 2000). Paula et al. (1995) demonstraram, que a infusão de Ang 1-7 potencializa as ações da bradicinina; desta maneira, aumenta a resposta hipotensora da bradicinina. Esses efeitos são mediados pelo receptor Mas (Santos et al., 2008; Varagic et al., 2008). Todo o SRAA descrito a cima está representado resumidamente na figura 2.

Os inibidores da ECA (captopril, maleato de enalapril, lisinopril, etc) e os bloqueadores do R-AT1 (losartan, candesartan, valsartan, etc) são capazes de aumentar os níveis de Ang 1-7 nos tecidos e no plasma. Os inibidores da ECA vão impedir a transformação da Ang I em Ang II. Assim os níveis de Ang I vão se elevar facilitando a formação de angiotensina 1-9 (Ang 1-9) e posterior formação de Ang 1-7. Já os inibidores do R-AT1 são capazes de potencializar os níveis de Ang II que é convertida em Ang 1-7 pela ECA-2.

Recentemente demonstrou-se que o aceturato de diminazeno (DIZE), uma droga de uso veterinário para o tratamento de infecções por *Trypanosoma*, ativa a ECA-2 e, desta forma, aumenta os níveis de Ang 1-7 (Kulemina & Ostrov, 2011). A ativação da ECA-2 tem potencial terapêutico no tratamento de várias doenças tendo em vista o fator protetor que o eixo ECA-2/Ang 1-7 no aparelho cardiovascular e nos rins. O potencial uso terapêutico do DIZE no tratamento de doenças cardiovasculares tem despertado a atenção de vários grupos de pesquisa.

1.3 Os sistemas renina-angiotensina aldosterona locais

Os SRAA locais são capazes de produzir Ang II por meio da ligação da renina ou pró-renina ao receptor específico e pró-renina (RER), localizado na superfície das células. A pró-renina interage com o receptor de pró-renina/renina (RPR) no coração, cérebro, olhos, fígado, rins, entre outros locais. Essa ligação faz com que o sítio ativo da pró-renina seja aberto, mas não quebrado (como no sistema circulatório); assim, ocorrerá a ativação total da pró-renina (renina) (Figura 1). Esse processo não enzimático de ativação da pró-renina em situações patológicas resulta em aumento na produção de fator de crescimento tumoral β (TGF- β) induzindo deposição de colágeno e fibrose. Além disso, induz ativação da ERK1/2, p38, tirosina quinase e ativa o plasmimogênio tipo I (figura 2). Essas vias de sinalização não são bloqueadas pelos inibidores da ECA ou pelos antagonistas do R-AT1, sendo relatado que elas

contribuem para a fibrose, nefrose e para a lesão em diversos órgãos, incluindo o coração (Kaneshiro et al., 2007; Nguyen & Danser, 2008).

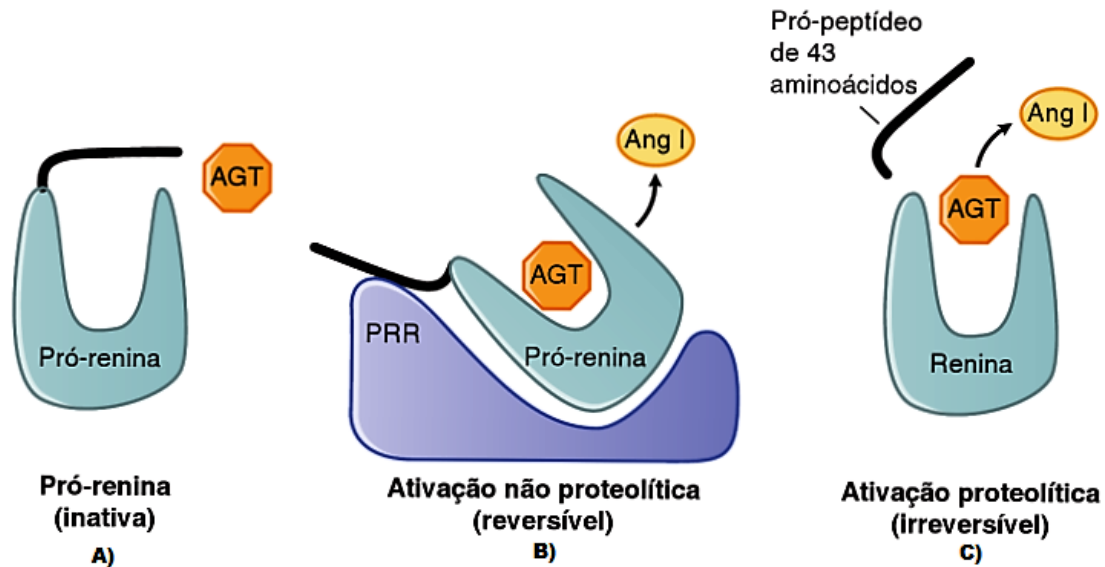


Figura 1. Ativação da renina não proteolítica e proteolítica. **A)** A pró-renina está inativa pelo pró-peptídeo (segmento escuro) que bloqueia o acesso do angiotensinogênio (AGT); **B)** Interação da pró-renina com o receptor de (pró) renina (PRR), permitindo a formação de Ang I; **C)** Remoção proteolítica do pró-peptídeo (Adaptado de Goodman; 12 ed; p. 724).

Foram descritos dois tipos de SRAA locais. O extrínseco no qual a ECA se localiza na superfície luminal das células endoteliais vasculares da circulação, e a renina circulante, de origem renal, pode ser captada pela parede arterial e por outros tecidos (Danser et al., 1994). O SRAA intrínseco é encontrado em diversos tecidos entre eles vasos sanguíneos, coração, rim, cérebro e hipófise e expressam mRNAs para renina, angiotensinogênio e/ou ECA. Desta forma, o SRAA intrínseco pode ser ativado independente do SRAA sistêmico ou endócrino (Paul et al., 2006).

(adenosina trifosfato). Na ausência do oxigênio têm-se como consequência o acúmulo de lactato e de íons de hidrogênio, o que provoca alterações no sistema de transporte iônico tanto em organelas como na membrana celular. A Na-K ATPase (bomba de sódio) é inibida, aumentando a perda de K^+ e aumentando os níveis de Na^{2+} no meio intracelular. O influxo de Na^+ , Cl^- e água ocasiona intumescimento da célula. Além disso, ainda têm-se o aumento de Ca^{++} citosólico, o que induz ativação de proteases e fosfolipases que levam ao rompimento do citoesqueleto. A degradação dos fosfolipídios e as alterações no metabolismo dos ácidos graxos alteram a fluidez e a função da membrana provocando um aumento da permeabilidade que resulta na ruptura celular (Krieger, 2008; p.544).

O outro mecanismo de perda celular é a apoptose. Esse processo ocorre na área infartada e não infartada. Nas áreas remotas do IAM ocorre devido à ativação de algumas proteínas envolvidas na programação da apoptose. Na fase aguda, que compreende até 72 horas após o IAM, têm-se aumento na expressão de Bax (proteína com ação pró-apoptótica) e redução na expressão de Bcl-2 (proteína com ação anti-apoptótica) (Cheng et al., 1996; Schwarz et al., 2006). Com apenas três horas após a isquemia é possível verificar redução na razão Bcl-2/Bax (Simonis et al., 2008). Nessa fase ocorre também, a ativação da caspase 3 associada com a liberação do fator indutor de apoptose (AIF, do inglês “apoptosis-induced factor”) mostrando grande importância na indução precoce da apoptose no miocárdio isquêmico. Esse processo apresenta grande influência no remodelamento cardíaco após IAM, fato demonstrado por Baldi et al. (2002) que observaram associação positiva entre o número de cardiomiócitos em apoptose e a progressão do remodelamento ventricular esquerdo.

A liberação do conteúdo citoplasmático durante a apoptose no espaço extracelular é capaz de gerar uma resposta inflamatória aguda que prejudica também as células adjacentes, sendo de extrema importância para o processo de reparo e cicatrização do miocárdio (Frangogiannis, 2008). Várias substâncias são liberadas durante apoptose, as quais apresentam funções quimioatáticas, desta maneira, atraindo células inflamatórias para o miocárdio isquêmico, iniciando-se a resposta imune inata, que é responsável pela limpeza dos restos celulares, além da síntese e liberação de diversos fatores (Frangogiannis & Entman, 2005). Os principais tipos celulares do sistema imune incluem os granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), os mastócitos e as células apresentadores de antígenos (macrófagos). A resposta inata é desencadeada pela sinalização dos TLR's (sigla referente ao inglês “toll like receptors”), que são proteínas transmembrana que medeiam a sinalização intracelular, estimulando a produção de várias substâncias, como citocinas, moléculas de adesão e espécies reativas derivadas do oxigênio (Erickson et al., 2008). Pelo menos 13 TLR's já foram identificados em mamíferos.

Porém, no coração os tipos 2 e 4 são os principais envolvidos na resposta ao IAM (Valeur & Valen, 2009).

A resposta imune inata inicia-se com a infiltração de neutrófilos na área do infarto, os quais são responsáveis pela fagocitose de restos celulares. O pico máximo deste processo ocorre no primeiro dia após a oclusão, mantendo-se elevado até o quarto dia. No segundo dia, temos um aumento local de macrófagos e linfócitos, permanecendo elevado por mais de quatro semanas (Fishbein et al., 1978; Yang et al., 2002). Os neutrófilos liberam localmente metaloproteinases (MMP, sigla referente ao inglês “matrix metaloproteinases”) que iniciam a degradação do colágeno. Os macrófagos iniciam a fagocitose do tecido necrótico, além de produzir e liberar citocinas para estimular a proliferação de fibroblastos e a intensa produção de colágeno (Lambert et al., 2008; Vilahur et al., 2011). O processo inflamatório está esquematizado na figura 3.

Três horas após a obstrução coronariana ocorre liberação de algumas citocinas, como as interleucinas; IL-6, IL-1 β e o fator de necrose tumoral α (TNF- α , sigla referente ao inglês “tumor necrosis factor”) (Deten et al., 2002; Vandervelde et al., 2007). A relação entre as citocinas pró-inflamatórias e o remodelamento ventricular foi observada por Moro et al. (2007), mostrando que a superexpressão de citocinas inflamatórias coincide com a progressão da disfunção cardíaca e a dilatação do ventrículo esquerdo em ratos após a isquemia seguida por reperfusão.

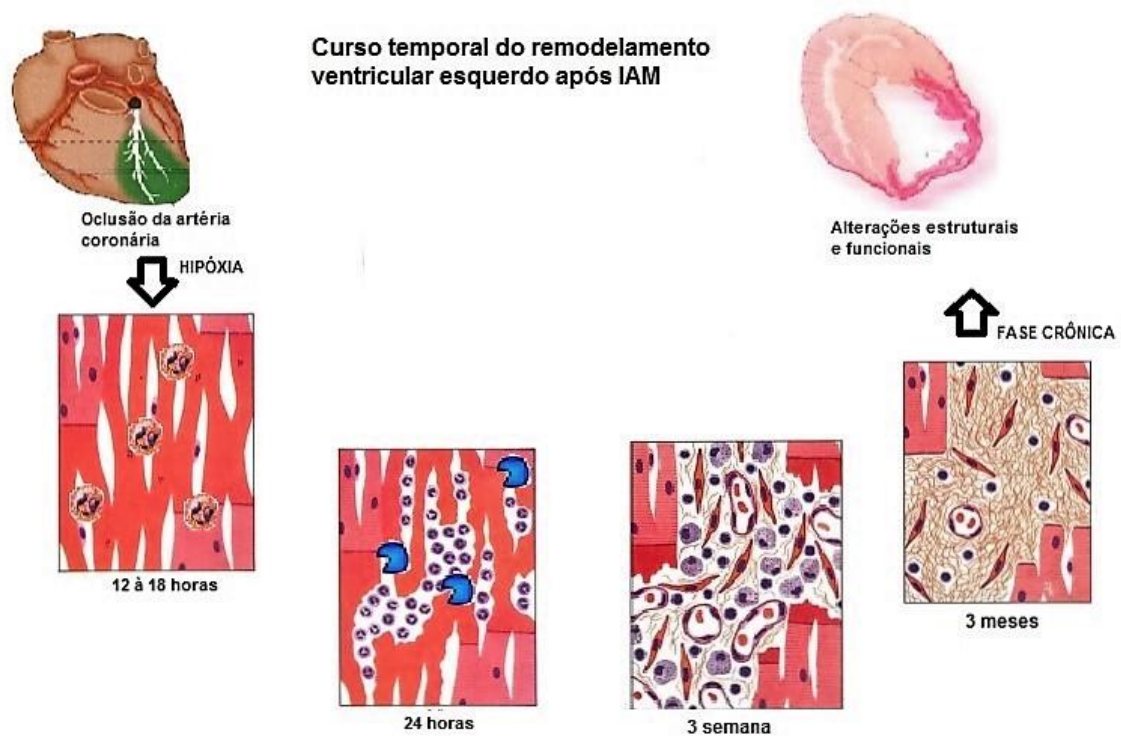
Após 72 horas inicia-se a fase crônica do IAM, onde a resposta inflamatória exacerbada e a sua persistência produzem modificações na matriz extracelular que irão contribuir para as alterações estruturais e funcionais do coração (Stefanon et al., 2013). As adaptações mais importantes consistem na síntese dos colágenos do tipo I e III e aumento do tamanho dos cardiomiócitos, processos que caracterizam a hipertrofia ventricular. Em síntese, a resposta inflamatória excessiva após o infarto está associada a efeitos deletérios sobre a estrutura e a função cardíaca (Jiang & Liao., 2010).

1.5 Remodelamento da matriz extracelular

O aumento exacerbado da resposta inflamatória leva a modificações da matriz extracelular com mudanças na forma e função do coração, contribuindo para a falência miocárdica (Spinale et al., 2006). O interstício cardíaco é composto por três subtipos de colágeno (I, III e V) que, apesar de representarem apenas 3% do volume miocárdico, são os principais

responsáveis pela rigidez das câmaras cardíacas. Além do colágeno, a matriz também contém outros componentes, como a fibronectina, a laminina e a elastina (Brower et al., 2006).

O colágeno sofre rápida degradação na fase aguda do infarto, o que leva ao deslizamento de feixes de miócitos (evento conhecido como “slippage”) o que contribui para a redução da espessura da parede ventricular e dilatação da câmara ventricular (Olivetti et al., 1990; Whittaker et al., 1991), conforme esquema mostrado na Figura 3.



ETAPAS DO REMODELAMENTO VENTRICULAR APÓS O INFARTO DO MIOCÁRDIO

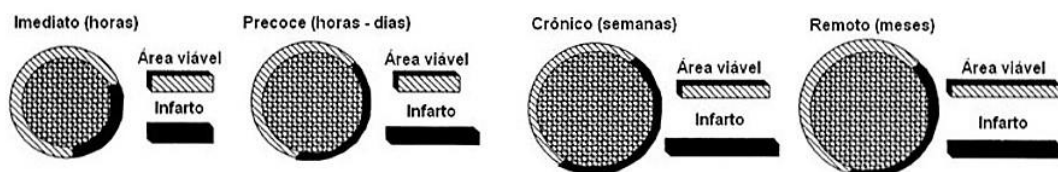


Figura 3. Desenvolvimento do infarto do miocárdio. A) Após 12 a 18 horas do IAM, infiltração de eosinófilos. B) 24 horas após IAM, presença de neutrófilos e liberação de metaloproteinases. C) Após 3 semanas, porções periféricas do infarto são compostas por tecidos de granulação com proeminentes capilares, fibroblastos, células linfóides e macrófagos. D) Depois de 3 meses ou mais, a região infartada foi substituída por tecidos de cicatrização (adaptado de Vanhoutte et al., 2006 e Rubin et al., 2006). Na parte inferior da figura estão ilustradas as etapas do remodelamento ventricular esquerdo após IAM (Adaptado de Paul, 2003)

A degradação de colágeno é regulada por uma variedade de citocinas inflamatórias tais como, $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 , $\text{IL-1}\beta$, $\text{TGF-}\beta$ (sigla derivada do inglês “Transforming growth factor”), fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF, do inglês “Conective Tissue Growth factor”), TIMP (do inglês “tissue inhibitor of matrix metalloproteinase”) (Creemers et al., 2001). O $\text{TGF-}\beta$

aumenta significativamente a partir do segundo dia após a oclusão coronariana e permanece elevado até a quarta semana. Esta citocina é responsável por converter fibroblastos em miofibroblastos com consequente aumento na deposição de colágeno. Além disso, o aumento na expressão do mRNA do CTGF após o IAM está envolvido na deposição de colágeno na região infartada também a partir da segunda semana após a isquemia na área não infartada durante o processo de cicatrização, mostrando a participação do CTGF no desenvolvimento da fibrose reativa (Dean et al., 2005). A matriz extracelular é constituída por um complexo de macromoléculas que fornece a rede de suporte estrutural de vasos e miócitos, sendo assim responsável pela geometria do miocárdio em repouso contribuindo também para as mudanças desta geometria durante o ciclo cardíaco. Desta forma, alterações da matriz produzem mudanças na geometria e podem alterar a função do coração (Spinale et al., 2006). Um dos fatores determinantes no processo de remodelamento cardíaco é a alteração da matriz extracelular pelas MMPs (Whittaker et al., 1991). As MMPs são enzimas essenciais envolvidas na dinâmica da matriz, estão presentes no interstício do miocárdio na forma inativa, e, quando ativadas, participam da degradação de colágeno (Creemers et al., 2001). Rohde et al. (1999) observaram que a inibição das MMPs pela administração de um inibidor específico (PD166793) reduz a dilatação do ventrículo esquerdo em camundongos após o IAM. Além disso, estudos têm demonstrado que alterações na atividade das MMPs estão associadas à progressão da insuficiência cardíaca após o IAM (Creemers et al., 2001). Diante desses dados, observamos que no miocárdio isquêmico a inflamação e o remodelamento da matriz estão envolvidos no processo de reparo tecidual. Portanto, podem ser importantes alvos terapêuticos para o controle do processo de remodelamento e prevenção da IC.

1.6 Ativação Neurohumoral no Curso da Remodelamento Ventricular

A isquemia miocárdica se associa a aumento dos níveis plasmático e teciduais de norepinefrina, um dos sinais mais precoces de ativação do sistema nervoso simpático o que contribui para aumento da contratilidade miocárdica (Brum et al., 2006), para a hipertrofia cardíaca (Marano et al., 2002), morte celular (Prabhu et al., 2003), produção de citocinas pró-inflamatórias (Murray et al., 2000), dilatação ventricular (Machackova et al., 2010) e arritmias. O estímulo simpático persistente, entretanto, contribui para remodelamento patológico do ventrículo e, portanto, predispõe ao desenvolvimento da IC (Du et al., 1999). A hiperatividade simpática pode ser observada na fase aguda do infarto, mas pode se manifestar

também na fase crônica, em consequência do aparecimento da disfunção ventricular (Mill et al., 1991).

A ativação simpática crônica induz modificações na sinalização dos receptores β -adrenérgicos, afetando diretamente o acoplamento excitação-contração (Triposkiadis et al., 2009). Essa ativação causa redução da responsividade (dessensibilização) e expressão gênica do receptor β_1 no coração que fisiologicamente é abundante e altamente responsivo. (Perrino et al., 2007). A hiperatividade simpática pode ser reduzida através do bloqueio central do receptor mineralocorticóide, uma vez que a aldosterona medeia parte desse processo (Huang & Leenen, 2005). Em humanos, a ativação do sistema nervoso simpático após infarto está relacionada com a diminuição da sensibilidade baroreflexa e aumento na resistência vascular (Ferguson et al., 1992). Um dos mecanismos propostos para explicar a gênese da hiperatividade simpática é a ativação do sistema renina-angiotensina cerebral. Experimentos feitos com infusão intracerebral, intraventricular ou sistêmico de losartan em ratos Wistar mostraram diminuição da hiperatividade simpática e da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo após o IAM (Huang et al., 2009), evidenciando assim, que a ativação do SRAA no cérebro desempenha um papel central no processo de remodelamento.

Durante o processo isquêmico observa-se aumento dos níveis de Ang II e do estresse oxidativo no curso do remodelamento ventricular (Virdis et al., 2011). Durante o processo inflamatório os macrófagos e fibroblastos são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), particularmente o ânion superóxido (O_2^-) que é gerado pela NADPH oxidase (Harrison et al., 2000). Esta oxidase catalisa a redução do oxigênio molecular utilizando NADH ou NADPH como doador de elétrons, sendo uma fonte constitutiva das EROs (Nedeljkovic et al., 2003). Além disso, ocorre redução na atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) no coração de ratos infartados (Hill & Singal., 1996). Essas enzimas fazem parte dos mecanismos celulares antioxidantes e participam na dismutação do O_2^- em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela SOD, que posteriormente é convertido em H_2O e O_2 pela CAT e GPx. Entretanto, essas enzimas têm um importante papel na prevenção da formação EROs (Schneider et al., 2004). As EROs são capazes de estimular a produção de citocinas inflamatórias e estas são capazes de estimular a produção das EROS (Nian et al., 2004). Na fase crônica do IAM, a formação das EROs e as citocinas inflamatórias ativam as MMPs e a deposição de colágeno, que contribui para a mudança estrutural e reparo tecidual (Deten et al., 2001).

1.7 Remodelamento Cardíaca e Ativação do Sistema Renina Angiotensina

O remodelamento cardíaco pode ser definido como uma sequência variada de alterações moleculares, celulares e intersticiais que ocorrem no miocárdio e que vão se manifestar clinicamente por alterações no tamanho, na massa, na geometria e na função do órgão, sendo o remodelamento a principal manifestação clínica do IAM (Pfeffer & Braunwald, 1990). A figura abaixo representa as mudanças no tamanho, massa e geometria do coração no processo de remodelamento ventricular após IAM (fase aguda e crônica).

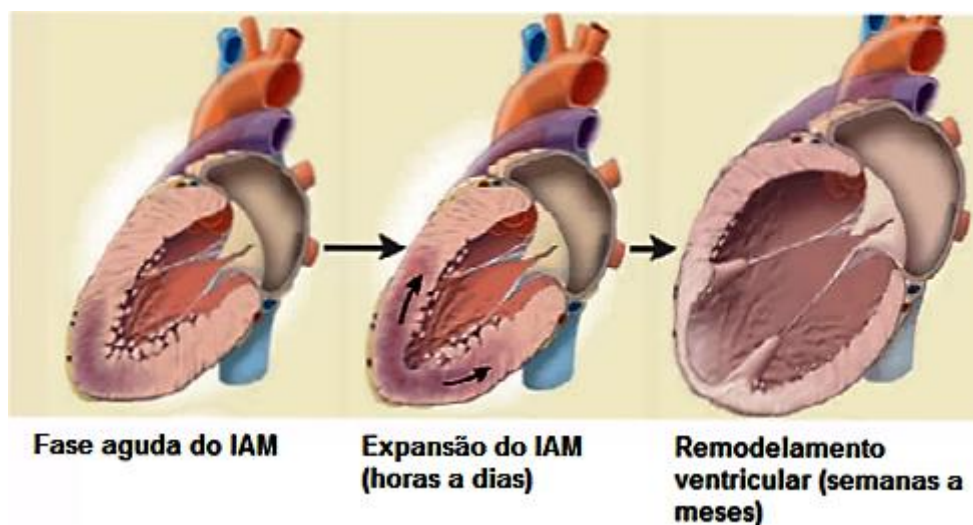


Figura 4. Remodelamento Ventricular após IAM (Remme et al., 2003)

A ativação crônica e exacerbada do SRAA após o IAM acarreta progressiva disfunção cardíaca (Mehta & Griendling, 2007). Os macrófagos e fibroblastos passam a expressar ECA com aumento da produção local de Ang II, sugerindo importante papel de regulação autócrina nas reações inflamatória e fibrogênica com estímulo à hipertrofia dos cardiomiócitos e aumento da deposição de colágeno (Sun et al., 2001; Busatto et al., 1997; Robert et al., 1999). O aumento na síntese de Ang II causa também produção de aldosterona que é um importante mediador da hipertrofia do cardiomiócito, fibrose e apoptose (Mulrow, 1999; Sohn et al., 2010). Estudos experimentais e clínicos revelaram que a inibição da ativação dos componentes do SRAA tais como, renina, ECA, AT1 e aldosterona atenua o remodelamento e previne a insuficiência cardíaca após o IAM. Além disso, outras pesquisas usando inibidores da ECA em pacientes infartados apontaram redução nas arritmias, prevenindo o desenvolvimento de insuficiência cardíaca e diminuindo a incidência de reinfarto (Mill et al., 1994; Schieffer et al., 1994).

A concentração proteica local diminui com a necrose miocárdica. As proteínas contráteis representam cerca de 80% do conteúdo proteico miocárdico. Após o IAM ocorre alteração da expressão dessas proteínas, o que poderia explicar a piora do desempenho mecânico do miocárdio que sobrevive ao infarto (Mill et al., 1994; Pfeffer et al., 1979; Mill et al., 1990). O tratamento de ratos infartados com captopril revelou preservação da qualidade das proteínas expressas no miocárdio remanescente ao infarto, sugerindo que as alterações de expressão local de proteínas contráteis poderiam decorrer do aumento local da produção de Ang II e não da ativação do SRAA sistêmico. Assim, a redução da deposição de colágeno no interstício miocárdico de ratos infartados e tratados com captopril poderia representar apenas uma das facetas de um fenômeno mais abrangente, ou seja, uma alteração generalizada da síntese protéica cardíaca.

A Ang II pode ser degradada pela ECA-2 formando Ang- 1-7, que também pode ser sintetizada por PEP e NEP. Além disso, a ECA-2 pode remover um único resíduo (Leu) da Ang I para gerar Ang-(1-9) que, por sua vez, pode ser clivado pela ECA ou pela NEP para formar a Ang 1-7 (Brosnihan et al., 1998; Tschope et al., 2002; Donoghue et al., 2000; Coates, 2003; Crackower et al., 2002; Danilczyk & Penninger., 2006). A ECA-2 parece ter, portanto, papel importante na modulação da função cardíaca. Após o IAM os níveis de ACE2 e Ang-(1-7) aumentaria como um mecanismo compensatório e protetor para o coração após a agressão isquêmica (YanFei Qi., 2013). A ativação desta enzima aumenta a produção de Ang1-7 exercendo ação protetora contra a isquemia cardíaca, ação já bem conhecida deste peptídeo (Der Sarkissian et al.; 2008 e Zhao YX., 2010). Em pesquisa realizada por Kulemina & Ostrov. (2011) observou-se que o Aceturato de Diminazeno (DIZE) é capaz de aumentar a velocidade catalítica da ECA-2 (figura 5). Sua eficácia como ativador da ECA-2 foi reconhecida pelo Food Drug Administration (FDA) após confirmação deste efeito em experimentos de clivagem da Ang II, que é considerado o principal efector do SRAA e substrato natural da ECA. O DIZE é um antiparasitário utilizado em veterinária como tripanocida e leishmanicida (Jean Moreno *et al.*, 2006, Kroubi et al., 2010).

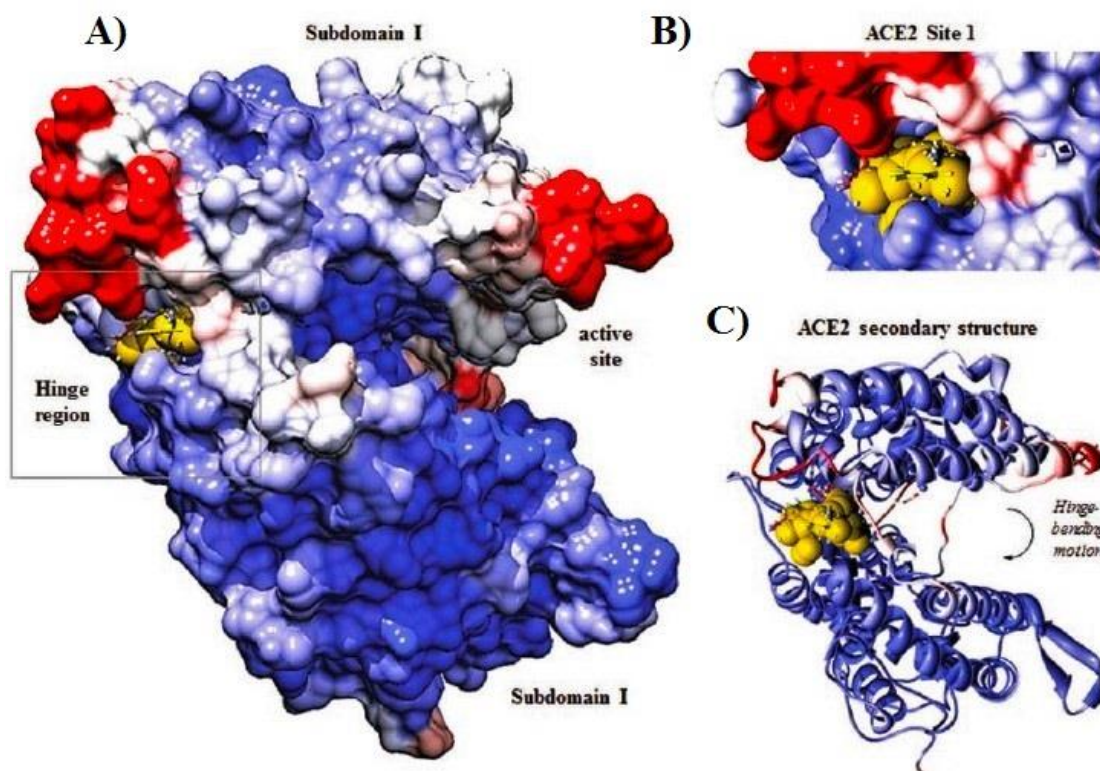


Figura 5. Representação molecular da ECA-2, usado como base estrutural para o acoplamento molecular do diminazeno (Kulemina & Ostrov, 2011). A) Na representação a região da dobradiça (Hinge region) separa os dois subdomínios da enzima que é caracterizada por uma alta acessibilidade e flexibilidade ao solvente; B) Representação da ampliada da região da dobradiça em amarelo; C) Estrutura molecular da ECA-2 na sua conformação aberta. As cores representam a área de superfície de acessibilidade, onde a cor vermelha representa mais alta acessibilidade e azul a menor área de acessibilidade; o amarelo representam o local selecionado para atuação do DIZE.

As ações de proteção cardiovascular da Ang-1-7 (Santos et al., 1988) levou a uma nova percepção dos mecanismos pelos quais o SRAA regula a homeostasia cardiovascular. Deste modo, a Ang-1-7 se tornou alvo de estudos nas últimas décadas, principalmente por terem sido observados vários efeitos benéficos os quais são opostos aos efeitos deletérios determinados pela Ang II (Santos et al., 2000). YanFei Qi et al. (2013) observaram que o DIZE têm ação protetora no miocárdio após infarto, preservando a fração de encurtamento, atenuando o aumento da pressão diastólica final no ventrículo esquerdo (PDFVE) e reduzindo a queda da dP/dt máxima no ventrículo esquerdo. Observou-se também diminuição da extensão do infarto e redução da apoptose. Este tratamento também mostrou modulação do RAS de uma maneira positiva, reduzindo agentes pró-inflamatórios como IL-1 B e TNF alfa (que contribui para o aumento da injúria isquêmica).

O remodelamento após IAM é fortemente dependente da ativação do SRAA local no coração. Há aumento da expressão da ECA, dos níveis teciduais de Ang II e dos receptores AT1 (Mill

et al., 1997). Os benefícios do uso dos inibidores da ECA no infarto do miocárdio e na insuficiência cardíaca já estão bem estabelecidos na literatura. Entretanto, existem situações onde o uso de bloqueadores da ECA ou antagonistas AT1 é limitado por efeitos colaterais ou por efeitos benéficos insuficientes. Portanto, o desvio da via da Ang II para a Ang-1-7 através da ativação da ECA-2 poderia representar uma via alternativa para controle do remodelamento pós-infarto e prevenção da insuficiência cardíaca. Dessa forma, o objetivo principal do nosso trabalho foi de verificar se a ativação da ECA-2 com o uso do DIZE poderia representar uma via alternativa para controle da fibrose reativa após o infarto com controle do processo de remodelamento pós-infarto e prevenção da IC.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

- Investigar os efeitos do tratamento com DIZE no remodelamento cardíaco após infarto do miocárdio experimental em ratos.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar os efeitos do tratamento com DIZE por 28 dias (crônico) na hemodinâmica cardíaca, hipertrofia e fibrose reacional miocárdica em ratos infartados.
- Comparar os efeitos do tratamento com DIZE com aqueles produzidos pelo tratamento crônico com losartan (bloqueador de receptores AT1).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e grupos experimentais

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos, pesando em média 233 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e mantidos em condições controladas e estáveis em biotério (temperatura 22° C, umidade de 50-70% e ciclo claro-escuro de 12/12horas) onde tiveram livre acesso à água e ração padrão para roedores. Os protocolos experimentais do presente projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFES (N° do CEUA: 006/2014).

Os animais foram distribuídos em cinco grupos experimentais, de acordo com o tratamento recebido:

- a) Ratos Controles + Placebo (Con-Pla): os animais deste grupo receberam água e ração *ad libitum*, por todo período experimental e foram submetidos a uma cirurgia fictícia de produção do infarto agudo do miocárdio (IAM) e tratados por 28 dias com placebo.
- b) Ratos Controles + DIZE (Con-DIZE): Animais submetidos à cirurgia fictícia e tratados com DIZE por 28 dias.
- c) Ratos Infartados-Placebo: Animais submetidos ao IAM e tratados por 28 dias com placebo.
- d) Ratos Infartados + DIZE (IM-DIZE): Animais submetidos ao IAM e tratados com DIZE por 28 dias.
- e) Ratos Infartados + Losartan (IM-Los): Animais submetidos ao IAM e tratados por 28 dias com o bloqueador AT1 losartan.

Os tratamentos foram feitos por injeção subcutânea diária de DIZE (Sigma Aldrich, 15 mg/kg/dia) ou Losartan (Sigma-Aldrich, 15 mg/kg). O veículo da diluição das drogas (NaCl 0.9%) foi usado como placebo.

3.2 Técnica do infarto do miocárdio

O IAM foi realizado pela oclusão permanente da artéria coronária descendente anterior esquerda, seguindo a técnica padrão amplamente descrita na literatura (Johns&Olson, 1954;

Pfeffer et al., 1979) e já padronizada em nosso laboratório (Mill et al., 1990; Baldo et al., 2008). Os animais foram anestesiados com mistura de 50mg/kg de cloridrato de ketamina e 10 mg/kg de cloridrato de xilazina por via intraperitoneal. Quando o animal atingiu um plano anestésico adequado (ausência de reflexo corneano) realizou-se a toracotomia e assepsia com álcool 70% na altura do 4º espaço intercostal e foi realizada a incisão (cerca de 2 cm) na pele do animal, seguida de dissecação dos músculos intercostais e preparação de sutura em bolsa (figura 6- A). Em seguida é feito a evisceração do coração e colocação de sutura com fio mononylon 6-0 em torno dos ramos descendentes anteriores da artéria coronária esquerda (figura 6- B e C). O coração era imediatamente reposicionado na cavidade torácica a qual era fechada por sutura em bolsa previamente preparada, ocorrendo, na maioria dos casos, imediata recuperação dos movimentos respiratórios (figura 6- D). Foi realizado o acompanhamento no eletrocardiograma para monitoramento dos diferentes tipos de arritmia (bloqueio átrio-ventricular, batimento prematuro, taquicardia, e fibrilação ventricular), e a recuperação dos movimentos respiratórios normais foram acompanhadas nos vinte minutos seguintes à cirurgia. Caso necessitassem, os animais recebiam assistência cardiorrespiratória. Os ratos controles foram submetidos a uma cirurgia fictícia em que todos os passos cirúrgicos foram feitos, exceto que a sutura em torno dos vasos coronários não foram apertada. Após recuperação da anestesia, os animais foram mantidos no biotério em gaiolas coletivas (4-5 animais por gaiola 45 x 30 x 20 cm) com ração e água fornecidas *ad libitum*. Os tratamentos com DIZE, losartan ou placebo foram iniciados no mesmo dia da cirurgia sendo mantido até o dia dos registros de hemodinâmica (28 dias).

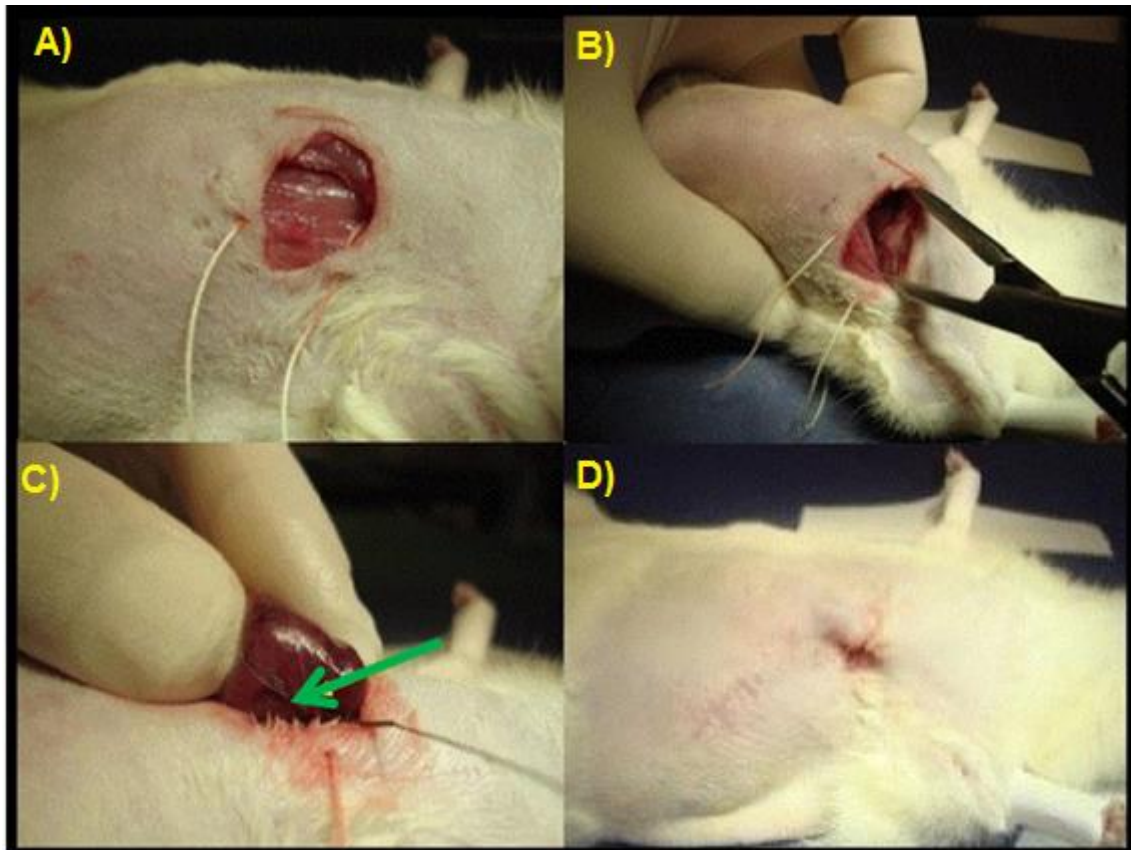


Figura 6. Etapas da técnica de infarto. A) Próximo a quarto espaço intercostal foi feito uma sutura em bolsa com fio de algodão. B) Preparo para exteriorização do coração. C) Exteriorização do coração e oclusão dos ramos descendentes anteriores da artéria coronária esquerda. D) Reposição do coração na cavidade torácica a qual é fechada por sutura em bolsa.

3.3 Hemodinâmica central (ventrículos direito e esquerdo)

Após 28 dias da cirurgia, os animais foram novamente anestesiados com mistura de 50mg/kg de cloridrato de ketamina e 10 mg/kg de cloridrato de xilazina, por via intraperitoneal. Após comprovação de entrada em plano profundo de anestesia (ausência de reflexo corneano) foi feita a dissecação da veia jugular externa direita e da artéria carótida comum esquerda (figura 7). Um catéter (PE50) preenchido com solução salina heparinizada (1:1000) foi introduzido na veia jugular e conectado a um transdutor de pressão (TRI 21, LETICA SCIENTIFIC INSTRUMENTS, ESPANHA) acoplado a um sistema de aquisição de dados (BIOPAC SYSTEM, INC MODEL MP100). O catéter foi cuidadosamente manipulado para avançar em direção à cavidade ventricular direita para obtenção de registro, por mais de cinco minutos, da pressão pulsátil do ventrículo direito, após registro estável. A primeira derivada de pressão era obtida eletronicamente (Mill et al., 2003; Resende et al., 2006; Resende & Mill, 2007).

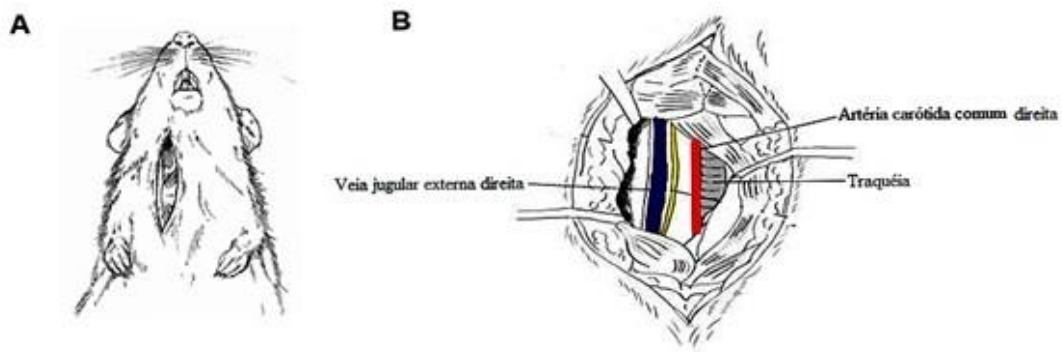


Figura 7. Cateterismo da veia jugular externa direita e artéria carótida comum direita. A) Visão ventral do animal com incisão expondo a musculatura do pescoço. B) Visão da localização da veia jugular direita e da artéria carótida comum direita (adaptado S.Lacchini)

Após obtenção e gravação das curvas de pressão no ventrículo direito, foi introduzida uma cânula (PE10 acomplada a PE50) na artéria carótida comum esquerda. Inicialmente era obtido registro da pressão arterial pulsátil e, em seguida, a cânula era avançada lentamente até penetrar na cavidade ventricular esquerda para registro local da pressão por um período aproximado de cinco minutos, após registro estável.

Os parâmetros de cada animal eram avaliados a partir das médias obtidas em 10 ciclos cardíacos consecutivos em ritmo regular analisados em registros diretos em tela de computador usando software Chart v. 7.0 (ADINSTRUMENTS INC, AUSTRÁLIA).

Os parâmetros avaliados no cateterismo ventricular direito e esquerdo foram frequência cardíaca (FC) foi obtida através do número de pulsos arteriais por minuto, obtida através do número de pulsos arteriais por minuto, além da pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD), pressões sistólica do ventrículo esquerdo e direito (PSVE e PSVD) e diastólica final do ventrículo esquerdo e direito (PDFVE), além da derivada máxima de contração e relaxamento do ventrículo esquerdo e direito ($dP/dt +$ e $dP/dt -$, respectivamente), representado na figura 8.

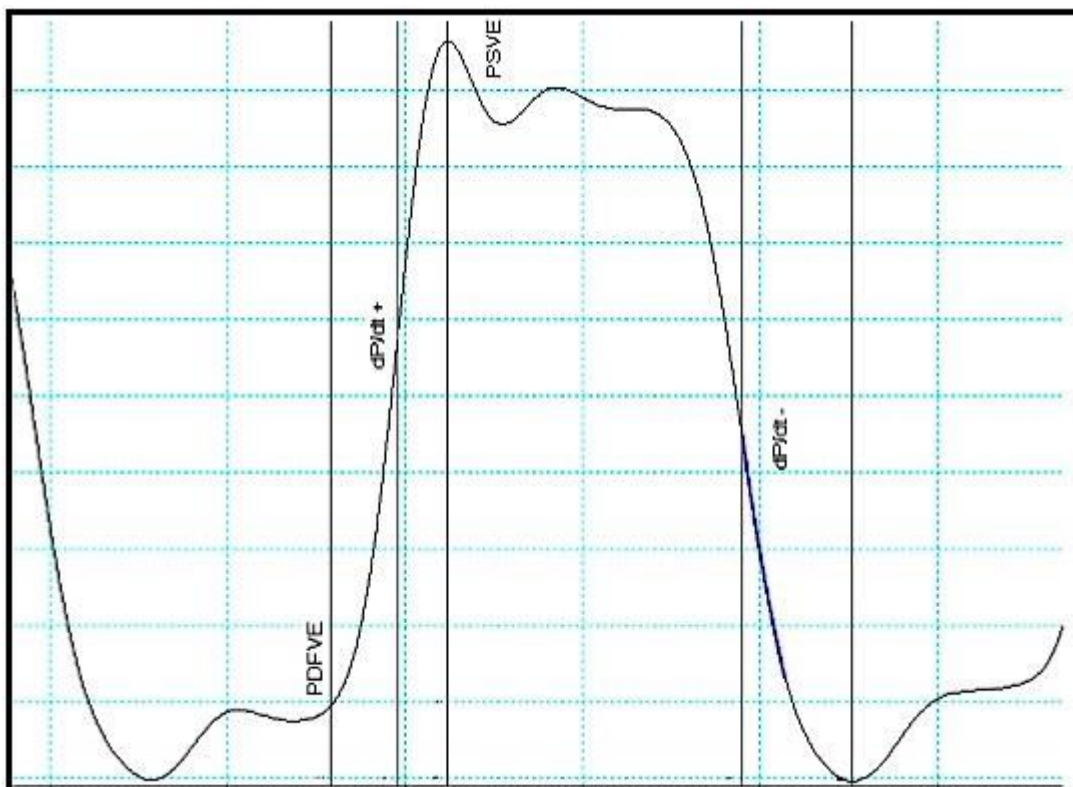


Figura 8. Figura representativa de uma onda de pressão intraventricular, delimitando os pontos de onde foram obtidos os valores de cada parâmetro.

3.4 Análise *in situ* da Dilatação do Ventrículo Esquerdo: Relação Pressão-Volume

A curva da relação pressão-volume foram obtidas seguindo a técnica descrita previamente (Fletcher et al., 1981) e já padronizada em nosso laboratório (Baldo et al., 2011). Após obtenção dos registros hemodinâmicos nos ventrículos e o animal ainda anestesiado, foi feita uma injeção in bolus de 0.4 mL de KCl 3 M através da veia jugular, determinando parada cardiorrespiratória instantânea no animal. O tórax era então rapidamente aberto e feita incisão na aorta para a introdução de uma cânula de dupla-luz (PE 50 inserido em PE 90) até a cavidade ventricular esquerda. A cânula de PE 90 é ligada a uma bomba de infusão de fluxo contínuo (BI 2000, INSIGHT EQUIPAMENTOS, BRASIL), representado na figura 9. Uma pequena incisão era feita na parede do ventrículo direito e um fio de sutura era usado para amarrar firmemente o anel atrioventricular impedindo refluxo de líquido do ventrículo esquerdo para o átrio esquerdo. O líquido existente na cavidade ventricular esquerda era eliminado através de compressão manual e, em seguida, a cânula PE50 e ligada ao transdutor de pressão. Iniciava-se então infusão de solução salina com fluxo de 0.68 mL/min pela cânula PE90 e registrava-se continuamente a pressão através da cânula PE50. A infusão foi feita até a

pressão ventricular esquerda chegar a 30 mmHg. Faz-se então novo esvaziamento da cavidade ventricular esquerda (desconexão da cânula PE50 do transdutor) repetindo-se a obtenção das curvas pressão x volume. Destas curvas são obtidas duas constantes (k_1 e k_2): a primeira (k_1) do início da infusão até a pressão atingir o valor de 5 mmHg ajustada através de regressão linear e cujo valor é inversamente proporcional à dilatação ventricular. A outra constante (k_2) é ajustada através de uma monoexponencial e diretamente proporcional à rigidez da câmara ventricular (Fletcher et al., 1981; Baldo et al., 2011).

Concluída a obtenção das curvas, o coração foi retirado, rapidamente lavado em solução salina e os ventrículos direito e esquerdo separados e pesados. Outros corações foram transferidos para solução de paraformol (pH = 7.4) para posterior processamento para análises histológicas.

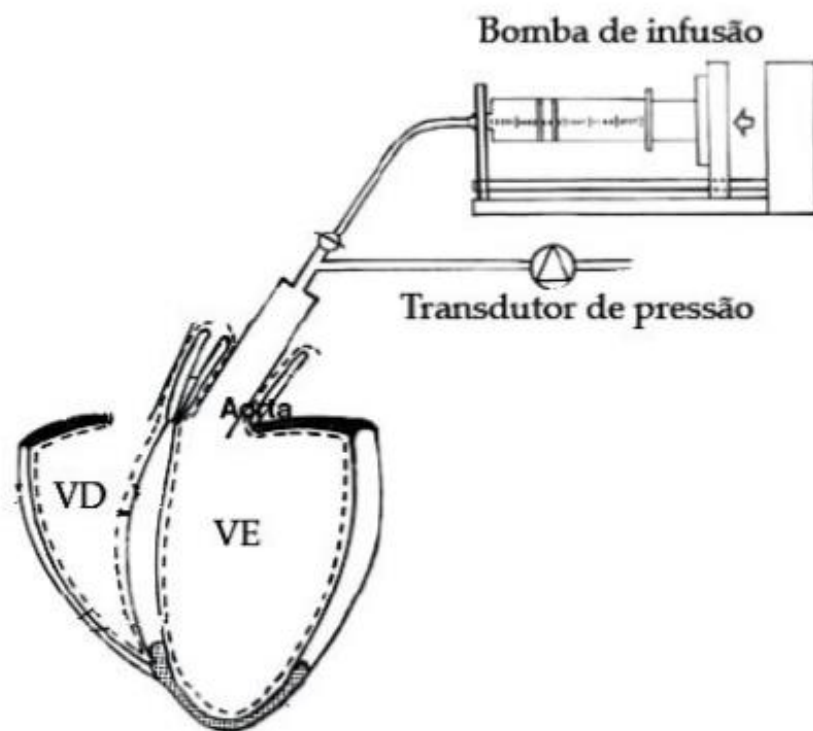


Figura 9. Representação da preparação para obtenção da curva pressão-volume. Adaptado de Jugdutt et al., 2007

3.5 Histologia

Os corações fixados em paraformol foram divididos em três fatias transversais (ápice, anel mediano (aproximadamente 3 mm) e base, somente o anel mediano foi utilizado para a análise (figura 10). As fatias passaram por um processo de desidratação em banho de álcool,

diafanização em banhos de xilol e inclusão em bloco com banhos de parafina. Foram feitos cortes transversais de cada fatia com espessura de 6 μ m os quais foram montados em lâminas de vidro. Os cortes foram corados com picrossirius (PicrossiriusRed, F3BA, FLUKA, EUA) ou hematoxilina e eosina (Vetec, Brasil) para as análises histológicas.

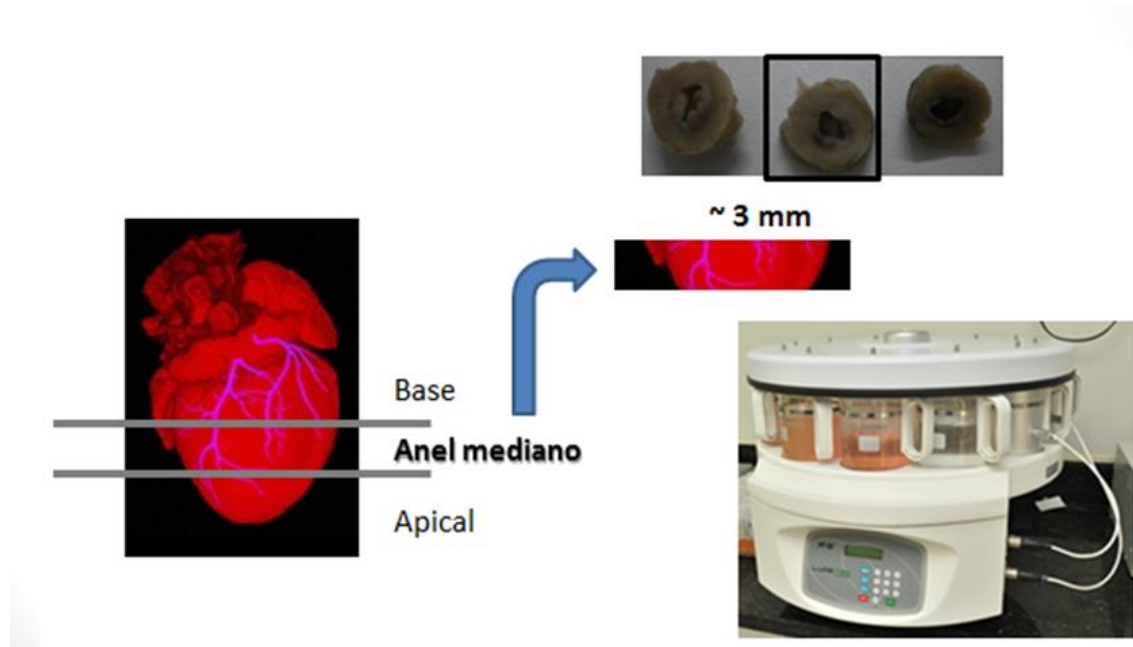


Figura 10. Esquema da preparação dos corações para histologia

3.6 Quantificação do colágeno

A área ocupada por colágeno no miocárdio remanescente ao infarto, isto é, excluindo as áreas de fibrose reparativa (cicatriz) e de transição, foi avaliada em cortes transversais do ventrículo esquerdo corados com picrossirius. Somente o colágeno intersticial da camada mesocárdica foi avaliado porque as fibras musculares apresentam uma direção circunferencial nessa região, sendo evitados os campos com vasos sanguíneos. Nos grupos IAM, somente a área ventricular remanescente foi avaliada. As imagens foram obtidas por uma câmera fotográfica (Sony, Japao) acoplada a um microscópio ótico (BEL Engineering, Top Light B2, Italia) sob aumento de 400 vezes. As imagens foram obtidas em cortes histológicos (6 a 8) de cada fatia do coração. Seis áreas de cada corte foram fotografadas. Utilizando o software específico (Image J, v. 1.43u, National Institute of Health, EUA) adequadamente calibrado, foi quantificado o percentual da área ocupada pelo colágeno em cada imagem (Suganoet et al., 2005). Como o colágeno se cora em vermelho, foi usada escala de cor para retirar as demais

tonalidades. O valor final para cada animal foi calculado pela média de todas as imagens obtidas.

3.7 Análise do tamanho da área de infarto

A extensão do infarto também foi quantificada nos cortes transversais corados com *Picrosirius*, por meio da planimetria digital, semelhante a descrições prévias (Fishbein et al., 1978). Uma característica relevante desse modelo de IAM experimental, é que a porcentagem do infarto no ápice é maior que na base do ventrículo esquerdo. No entanto, o corte transversal medial do ventrículo esquerdo, reflete o tamanho do infarto de todo o ventrículo esquerdo. O tamanho da área de infarto está diretamente relacionado com alterações funcionais cardíacas, portanto, foram excluídos os animais com área de infarto inferior a 30%, devido não apresentarem alterações hemodinâmicas significativas e não ser uma área significativa para evoluir a IC.

O perímetro epicárdico foi manualmente delimitado com o auxílio do programa de análise de imagens, Image J. Posteriormente, o perímetro epicárdico correspondente à área infartada (delimitada pela coloração com *Picrosirius*) foi estabelecido. Todo procedimento foi realizado também para o endocárdio. A extensão do infarto foi apresentada como o valor percentual médio do perímetro infartado do ventrículo esquerdo, calculado pela fórmula (circunferência do endocárdio + epicárdio do tecido infartado/ circunferência do endocárdio + epicárdio do ventrículo esquerdo). O tamanho do infarto foi determinado pela média de 3 cortes transversais (Bozi et al., 2013)

3.8 Análise da Hipertrofia

A avaliação da hipertrofia cardíaca foi realizada de acordo com a técnica descrita previamente (Lee et al., 2007; Tan et al., 2010; Ocaranza et al., 2010). Para excluir diferenças no tamanho dos cardiomiócitos nas diferentes áreas do miocárdio, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina em cortes na região média do ventrículo esquerdo. As imagens foram capturadas com câmera fotográfica (Sony; Japão) acoplada a um microscópio ótico (BEL Engineering, Top Light B2, Itália) sob aumento de 400 vezes. A área de secção transversal de cada miócito era medida contornando cuidadosamente miócitos posicionados

perpendicularmente ao plano da secção, com núcleo visível e com a membrana íntegra. Um total de 40 a 50 células foram medidas em cada rato na área remanescente ao infarto (septo interventricular no grupo SHAM), excluindo a zona de borda. As medidas foram feitas utilizando o programa de imagens ImageJ (v. 1.43u, National Institute of Health, EUA).

3.9 Análise estatística

Os dados descritos no texto, figuras e tabelas são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Para verificar a adequação dos dados à distribuição Gaussiana, foi usado o teste de Kolmogorov-Smirnov. O coeficiente de variação foi usado para representar a variabilidade da área do infarto. Comparações entre três médias independentes foram feitas utilizando a análise de variância (ANOVA) de um fator. Quando um segundo fator foi introduzido nas análises, a ANOVA de dois fatores foi utilizada. Quando a ANOVA foi significativa, foi realizado o teste de Bonferroni's para comparações múltiplas. A curva de mortalidade foi construída seguindo o modelo de Kaplan-Meier, e as diferenças entre as curvas foram analisadas pelo teste chi-quadrado. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software GraphPad Prism 6, e a construção das figuras foi realizada com o auxílio do software GraphPad Prism 6 e do OriginPro (v. 7.5, Origin Lab Corporation, Northampton, MA, EUA).

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da Mortalidade

Não houve mortalidade entre os 21 animais submetidos à cirurgia fictícia do IAM. Porém, dos 73 animais submetidos à cirurgia do IAM, morreram 9 dos 28 animais do grupo IM-Pla, 4 dos 25 do grupo IM-DIZE e 1 dos 20 do grupo IM-Los. A mortalidade relacionada ao IM-Pla foi de 32%; IM-DIZE 16%; IM-Los 5 %. A figura 11 mostra as curvas de Kaplan-Meier da mortalidade nos três grupos de animais com IAM. Observou-se mortalidade maior e mais precoce nos animais infartados e tratados com placebo. No grupo tratado com losartan só ocorreu mortalidade nos 2 primeiros dias.

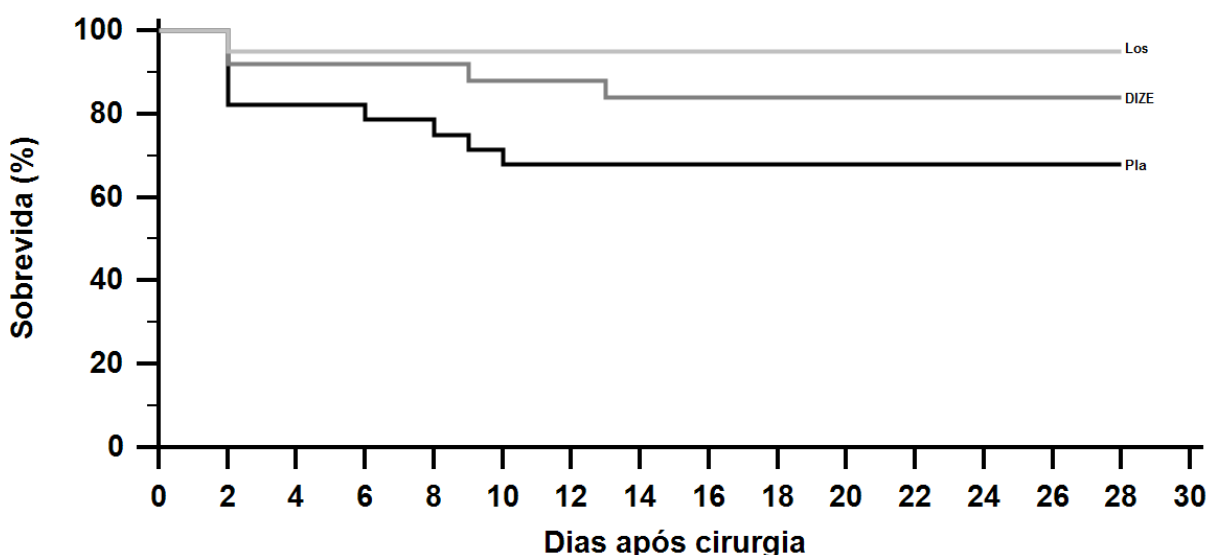


Figura 11. Curva de Kaplan-Meier para a mortalidade dos ratos ao longo de 28 dias após o infarto. IM-Pla: Infarto do Miocárdio + Placebo; IM-DIZE: Infarto do Miocárdio + diminazene; IM-Los: Infarto do Miocárdio + Losartan. Não se detectou diferença estatística entre os grupos ($p=0,065$).

4.2 Avaliação da área do infarto

As médias das áreas de infarto dos grupos estão na figura 12, sendo de $43,5 \pm 1,5\%$ para o grupo IM-Pla ($n=8$); $44 \pm 1,2\%$ para o grupo IM-DIZE ($n=10$) e de $41,3 \pm 2,8\%$ para o grupo IM-Los ($n=7$), sem apresentarem diferença estatística entre os grupos. Dos animais submetidos à análise histológica foram excluídos 15 animais do grupo IM-Los, 13 animais IM-DIZE e 10 animais IM-Pla.

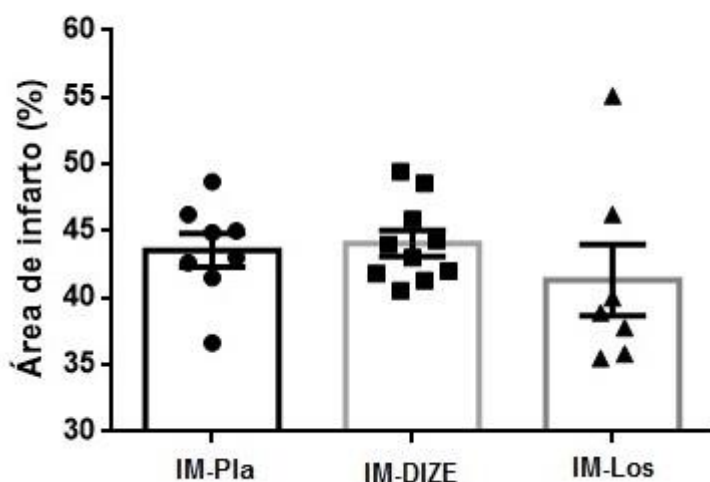


Figura 12. Representação da área da infartada após vinte e oito dias da ligadura coronariana. Os símbolos representam os dados de cada rato. Os dados foram comparados pela ANOVA de um fator com média e erro padrão da média, adotando a significância de $p < 0,05$. . IM-Pla: Infarto do Miocárdio + Placebo; IM-DIZE: Infarto do Miocárdio + diminazene; IM-Los: Infarto do Miocárdio + Losartan.

4.3 Parâmetros Morfométricos

Os valores médios e seus respectivos desvios-padrão dos pesos corporais, pesos dos ventrículos, pulmões, rim, fígado e a correção dos pesos dos respectivos órgãos pelos pesos corporais e porcentagem de água nos órgãos encontra-se na tabela 1, onde estão expostas as análises estatísticas dos grupos Con-Pla, Con-DIZE, IM-Pla, IM-DIZE. Na tabela 2, onde estão as análises estatísticas com apenas os três grupos infartados (IM-Pla, IM-DIZE e IM-Los). Para realização do peso médio do VD e do VE corrigido pelos pesos corporais (VD/PC e VE/PC), foram usados animais preparados para análise bioquímica, porém essa parte do protocolo não foi feita, os pesos dos respectivos animais estão expostos na tabela 1 e 2.

Para o peso corporal antes da cirurgia e no final do experimento os resultados se mostraram semelhantes (tabelas 1 e 2) em todos os grupos de animais avaliados. A análise estatística mostrou que o VD/PC foram maior no grupo IM-Pla quando comparados aos grupos Con-DIZE, Con-Pla, porém o grupo IM-DIZE sofreu uma redução do peso do quando comparado ao grupo IM-Pla. O VD/PC do grupo IM-DIZE foi semelhante ao grupo IM-Pla. Apresentou aumento significativo para o peso do pulmão e porcentagem de água nos animais infartados, porém não mostrando diferença associada ao tratamento.

Tabela1. Parâmetros ponderais avaliados vinte e oito dias após a cirurgia

	Con-Pla (n=8)	Con-DIZE (n=6)	IM-Pla (n=7)	IM-DIZE (n=6)
Peso corporal				
Inicial (g)	233±8	239±5	230±4	225±6
Peso Corporal				
Final (g)	363±7	375±9	361±8	329±9
Peso final para				
VD e VE (g)	344±9	331±9	300±7	275±8
VE (mg)	658±21	643±22	669±33	636±35
VE/PC (mg/g)	1,91±0,41	1,94±0,37	2,24±0,72	2,31±0,14
VD (mg)	190±10	223±0,01	332±33*	226±10#
VD/PC (mg/g)	0,55±0,03	0,68±0,05	1,10±0,04*	0,83±0,03*
Pulmão (mg)	1803±68	1795±71	2322±116*	2109± 110*
Pulmão/PC	4,96±0,14	4,79±0,19	6,46±0,34*	6,41±0,77*
(mg/g)				
% H2O Pulmão	80,2±0,004	80,4±0,003	81,2±0,01*	80±0,006#
Fígado (g)	14,6±0,7	15,1±0,6	14,1±0,5	13,6±0,5
Fígado/PC				
(mg/g)	40,22±0,5	40,28±0,23	39,05±0,13	41,33±0,2
% H2O Fígado	73,3±0,001	72,2±0,002	73,1±0,005	73,2±0,004
Rim (mg)	1421±58	1396±69	1260±45	1203±39
Rim/PC				
(mg/g)	3,91±0,02	3,72±0,02	3,49±0,02	3,65±0,01
% H2O Rim	80±0,003	79±0,01	78,1±0,004	78,4±0,02

VE, ventrículo esquerdo; VD, ventrículo direito; PC, peso corporal; Con-DIZE: Controle + DIZE; Con-Pla: Controle + Placebo; IM-Pla: Infarto do Miocárdio + Placebo; IM-DIZE: Infarto do Miocárdio + diminazene; IM-Los: Infarto do Miocárdio + Losartan. * $p < 0,05$ vs Con-DIZE e Con-Pla; # $p < 0,05$ vs IM-Pla

Com relação à comparação entre os três grupos infartados (tabela 2) houve diferença estatística do peso médio do VD tanto com tratamento com DIZE quanto com tratamento com losartan quando comparado ao grupo IM-Pla, porém somente o grupo IM-Los reduziu a relação VD/PC quando comparado o grupo IM-Pla. No grupo tratado com losartan foi observado redução do peso médio do pulmão e pulmão/PC quando comparados com os grupos IM-Pla e IM-DIZE. A porcentagem de água no pulmão tanto no grupo IM-Los quanto no grupo IM-DIZE foi menor que no grupo sem tratamento. Não houve diferenças estatísticas

entre os três grupos com relação ao peso corporal inicial, peso corporal final, VE, VE/PC, fígado, fígado/PC, % de H₂O no fígado, Rim, Rim/PC, % de H₂O no Rim.

Tabela 2. Parâmetros ponderais entre os três grupos infartados avaliados vinte e oito dias após a cirurgia.

	IM-Pla (n=7)	IM-DIZE (n=6)	IM-Los (n=7)
Peso corporal			
Inicial (g)	230±4	225±6	240±7
Peso Corporal			
Final (g)	361±8	329±9	329±10
Peso final para			
VD e VE (g)	300±7	275±8	316±8
VE (mg)	669±33	636±35	647±27
VE/PC (mg/g)	2,24±0,72	2,31±0,14	2,05±0,85
VD (mg)	332±33	226±10#	243±20#
VD/PC (mg/g)	0,89±0,04	0,83±0,03	0,78±0,07#
Pulmão (mg)	2322±116	2109± 110	1859±93#
Pulmão/PC (mg/g)	6,46±0,34	6,41±0,77	5,65±0,24#\$
% H₂O no Pulmão	81,2±0,01	80±0,006#	80±0,008#
Fígado (g)	14,1±0,5	13,6±0,5	13,3±0,7
Fígado/PC (mg/g)	39,05±0,13	41,3±0,2	40,4±0,15
% H₂O no Fígado	73,1±0,005	73,2±0,004	73,1±0,005
Rim (mg)	1260±45	1203±39	1285±95
Rim/PC (mg/g)	3,49±0,02	3,65±0,01	3,90±0,013
% Água no Rim	78,1±0,004	76,4±0,02	78,3±0,01

VE, ventrículo esquerdo; VD, ventrículo direito; PC, peso corporal; IM-Pla: Infarto do Miocárdio + Placebo; IM-DIZE: Infarto do Miocárdio + diminazene; IM-Los: Infarto do Miocárdio + Losartan. # $P < 0,05$ vs IM-Pla; \$ $p < 0,05$ vs IM-DIZE

4.4 Medidas Hemodinâmicas - Ventrículo Esquerdo

Nas tabelas 3 e 4 estão apresentadas FC, PAS e PAD. Em ambas as tabelas não houve diferença estatística significativa entre esses parâmetros.

Tabela 3. Dados hemodinâmicos da artéria carótida

	Con-Pla (n=10)	Con-DIZE (n=10)	IM-Pla (n=6)	IM-DIZE (n=8)
FC (bpm)	255±7	248±8	261±9	251±8
PAS (mmHg)	103±3	109±2,2	105±2,1	105±4
PAD (mmHg)	81±3	78±2,8	83±2,2	85±3,2

FC: Frequência Cardíaca; PAS: Pressão Arterial Sistólica; PAD: Pressão Arterial Diastólica; Con-DIZE: Controle + DIZE; Con-Pla: Controle + Placebo; IM-Pla: Infarto do Miocárdio + Placebo; IM-DIZE: Infarto do Miocárdio + diminazene; IM-Los: Infarto do Miocárdio + Losartan. $p > 0,05$

Tabela 4. Dados hemodinâmicos da artéria carótida dos três grupos infartados

	IM-Pla (n=6)	IM-DIZE (n=8)	IM-Los (n=7)
FC (bpm)	261±9	251±8	251±9
PAS (mmHg)	105±2,1	105±4	100±1,8
PAD (mmHg)	83±2,2	85±3,2	73±3,3

FC: Frequência Cardíaca; PAS: Pressão Arterial Sistólica; PAD: Pressão Arterial Diastólica; Infarto do Miocárdio + Placebo; IM-DIZE: Infarto do Miocárdio + diminazene; IM-Los: Infarto do Miocárdio + Losartan. $p > 0,05$

Nos parâmetros hemodinâmicos do VE houve diferença estatística significativa na pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE) do grupo IM-Pla (101±3,1 mmHg; n=6) em relação ao Con-Pla (113±1,7 mmHg; n=9) e Con-DIZE (122±3,1 mmHg; n=9) e encontramos diferença significativa do grupo IM-DIZE (110±0,7 mmHg; n=8) quando comparado ao grupo IM-Pla. Entre os três grupos infartados apresentados, houve aumento da PSVE nos grupos IM-Los (111±3,5 mmHg; n=7) e IM-DIZE quando comparado ao grupo IM-Pla (figura 13).

O grupo IM-DIZE (15±1,6 mmHg/s; n=8) apresentou pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) menor quando comparado com o IM-Pla (26±3,3) e na comparação dos três grupos infartados os grupos IM-DIZE e IM-Los foram capazes de reduzir a PDFVE de forma estatisticamente significativa. Além disso, o grupo IM-DIZE (dp/dt+ 3884±104 mmHg/s; dpdt-: -2798±120 mmHg/s; n=8) foi capaz de aumentar a dp/dt+ e a dp/dt- quando comparado com o grupo IM-Pla (dp/dt+ 3014 ± 161 mmHg/s; dpdt-: -2333±91 mmHg/s; n=6). Em comparação dos três grupos infartados não observamos diferenças estatística na dp/dt- entre os grupos. Porém os grupos IM-Los (dp/dt+: 4146±131 mmHg/s; n=7) e IM-DIZE (dp/dt+ 3884±104 mmHg/s; n=8) foram capazes de elevar a dp/dt+. Os valores dos parâmetros hemodinâmicos do VE estão representados na figura 13.

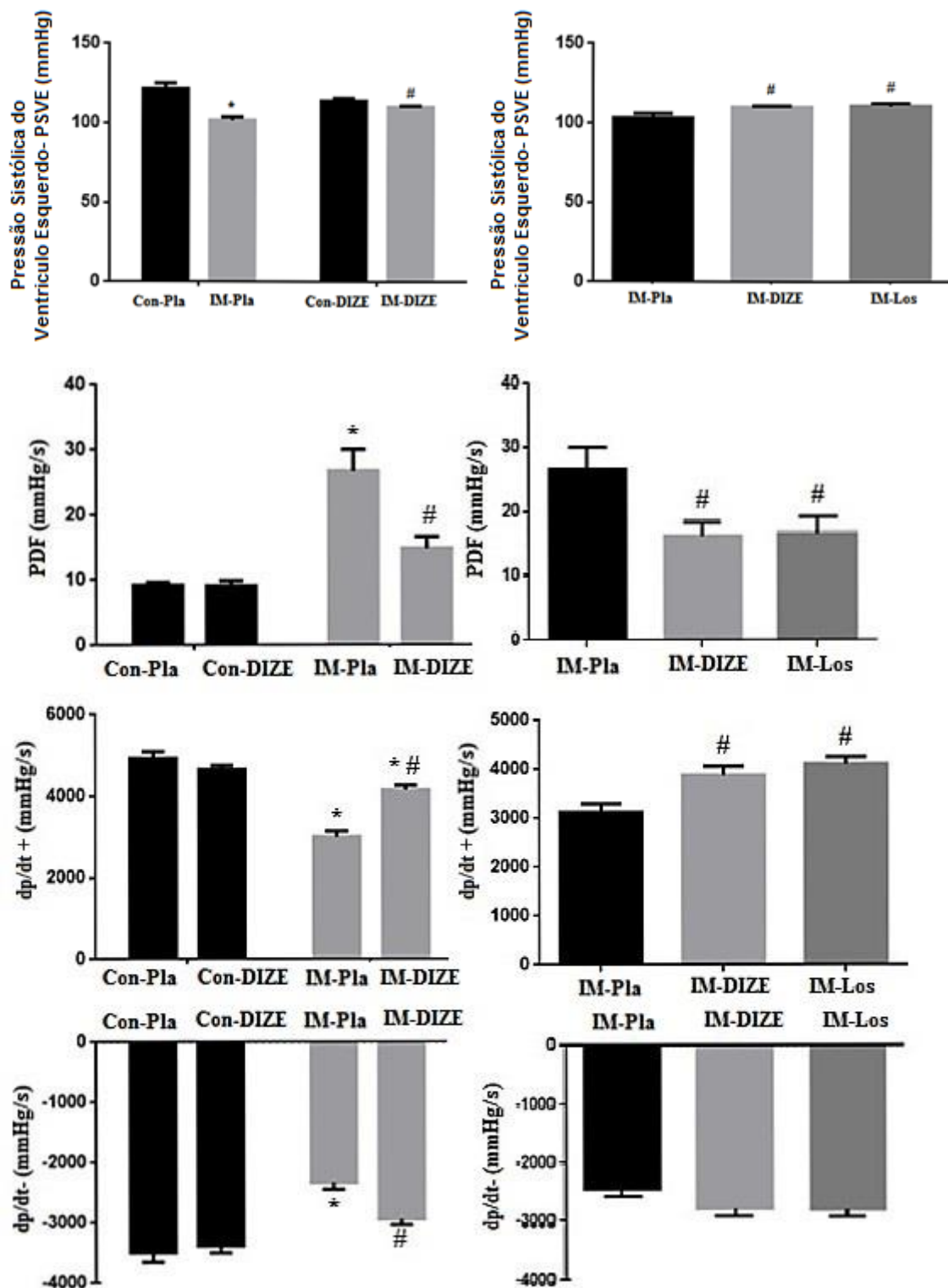


Figura 13. Função hemodinâmica por cateterismo do ventrículo esquerdo após vinte e oito dias após a cirurgia do IAM e cirurgia fictícia do IAM. Os gráficos à esquerda estão representados pelos grupos Con-DIZE; Con-Pla; IM-Pla; IM-DIZE e os gráficos à direita estão representados somente pelos grupos infartados. PDF: Pressão Diastólica Final; dp/dt+: derivada máxima positiva; dp/dt-: derivada máxima negativa. Con-DIZE: Controle + DIZE; Con-Pla: Controle + Placebo; IM-Pla: Infarto do Miocárdio + Placebo; IM-DIZE: Infarto do Miocárdio + diminazene; IM-Los: Infarto do Miocárdio + Losartan. *p<0,05 Con-DIZE e Con-Pla; #p <0,05 IM-Pla

4.5 Medidas Hemodinâmicas - Ventrículo Direito

A figura 14 mostra que a pressão do ventrículo direito apresentou diferença estatística entre o IM-Pla ($40 \pm 0,6$ mmHg) com relação aos grupos Con-Pla ($30 \pm 1,2$ mmHg; $n=7$) e Con-DIZE ($29 \pm 0,8$ mmHg; $n=8$) o IM-DIZE não se mostrou diferente dos grupos controles. Porém não houve diferença estatística da pressão do VD entre os grupos infartados (IM-DIZE (37 ± 2 mmHg; $n=8$) e IM-Los ($36,71 \pm 0,8$ mmHg; $n=7$)) em comparação ao IM-Pla ($40 \pm 0,6$ mmHg; $n=6$).

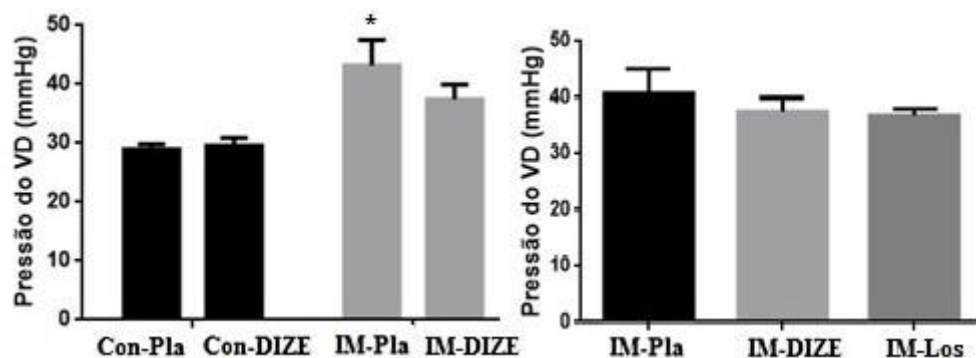


Figura 14. Hemodinâmica por cateterismo do ventrículo direito 28 dias após o IAM ou cirurgia fictícia. Os dados do gráfico à esquerda foram analisados por ANOVA dois fatores comparando os grupos. Os dados do gráfico à direita foram analisados por ANOVA um fator. Con-DIZE: Controle + DIZE; Con-Pla: Controle + Placebo; IM-Pla: Infarto do Miocárdio + Placebo; IM-DIZE: Infarto do Miocárdio + diminazene; IM-Los: Infarto do Miocárdio + Losartan. * $p < 0,05$ vs Con-DIZE e Con-Pla

Nos parâmetros hemodinâmicos a pressão diastólica final do VD não apresentou diferença estatística entre os grupos Con-Pla ($6 \pm 1,2$ mmHg; $n=7$); Con-DIZE ($6 \pm 0,4$ mmHg; $n=8$); IM-Pla ($9,5 \pm 1,3$ mmHg; $n=6$); IM-DIZE ($8,9 \pm 0,5$ mmHg; $n=8$) nem apresentou diferença estatística entre os três grupos infartados IM-Pla ($9,5 \pm 1,3$ mmHg; $n=6$); IM-DIZE ($8,9 \pm 0,5$ mmHg; $n=8$); IM-Los ($9 \pm 0,9$ mmHg; $n=7$). A $dP/dt+$ no VD também não apresentou diferença estatística entre os grupos: Con-Pla (1101 ± 49 mmHg/s; $n=7$); Con-DIZE (1017 ± 29 mmHg/s; $n=7$); IM-Pla (1203 ± 40 mmHg/s; $n=6$); IMD (1132 ± 54 mmHg/s; $n=8$); nem apresentou diferença estatística entre os três grupos infartados IM-Pla (1203 ± 40 mmHg/s; $n=6$); IM-DIZE (1132 ± 54 mmHg/s; $n=8$); IM-Los (1063 ± 32 mmHg/s; $n=7$). A $dP/dt-$ no VD não apresentou diferença estatística entre os grupos: Con-DIZE (-842 ± 43 mmHg/s; $n=8$), Con-Pla (-816 ± 43 mmHg/s; $n=7$); IM-DIZE (-809 ± 44 mmHg/s; $n=8$); IM-Pla (-1056 ± 30 mmHg/s; $n=6$). Porém apresentou diferença estatística na comparação entre os três grupos

infartados, IM-Pla (-1056±30 mmHg/s; n=6); IM-DIZE (-809±44 mmHg/s; n=8); IM-Los (-787,4±28,2 mmHg/s; n=7), como mostrado na figura 15.

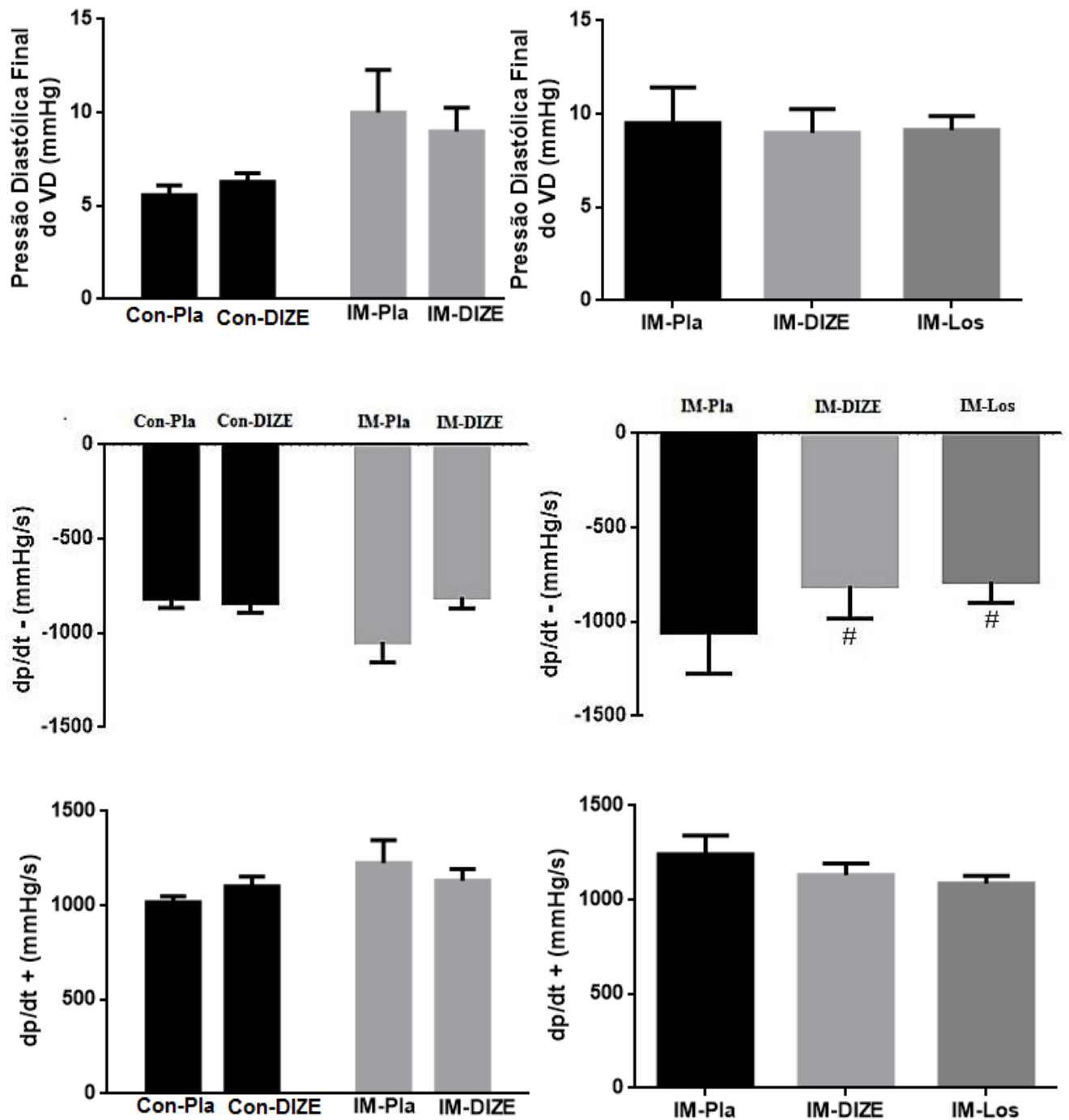


Figura 15. Hemodinâmica do VD no cateterismo, mostrando os dados da pressão diastólica final e da $-dp/dt$ e $dp/dt + A$ figura à esquerda foi testada por ANOVA de dois fatores e o gráfico à direita foi realizado ANOVA de um fator com post hoc Bonferroni. Con-DIZE: Controle + DIZE; Con-Pla: Controle + Placebo; IM-Pla: Infarto do Miocárdio + Placebo; IM-DIZE: Infarto do Miocárdio + diminazene; IM-Los: Infarto do Miocárdio + Losartan. # $p < 0,05$ vs IM-Pla.

4.6 Curva Pressão Volume

A figura 16 apresenta as curvas pressão-volume de 0-30 mmHg que foi obtida após o término da hemodinâmica. Ainda com o rato anestesiado era produzida parada cardíaca por injeção de KCl 3 M. No coração parado era feita a injeção contínua de solução fisiológica no balão com registro simultâneo do volume injetado e da pressão no interior da câmara ventricular. Em nossos achados, é possível observar um desvio para a direita nas curvas referentes aos ratos infartados, indicando que o coração desses animais foi capaz de acomodar mais volume dentro da cavidade ventricular para um determinado valor de pressão. Esta curva apresenta o índice relativo à dilatação e rigidez ventricular, onde o gráfico à direita apresentou diferença estatística do grupo IM-Pla ($0,78 \pm 0,2$ mmHg/mL; $n=8$) quando comparado com os grupos Con-DIZE ($0,59 \pm 0,002$ mmHg/mL; $n=12$) e Con-Pla ($0,46 \pm 0,02$ mmHg/mL; $n=13$), porém o grupo submetido ao tratamento do DIZE ($0,64 \pm 0,02$ mmHg/mL; $n=7$) não apresentou diferença com relação aos grupos Con-DIZE, Con-Pla, IM-Pla. O gráfico à direita mostra que os valores dos animais tratados com DIZE ficaram bem próximos aos valores do controle positivo (IM-Los: $0,65 \pm 0,04$ mmHg/mL; $n=6$), onde ambos apresentaram diferença estatística quando comparados ao grupo IM-Pla.

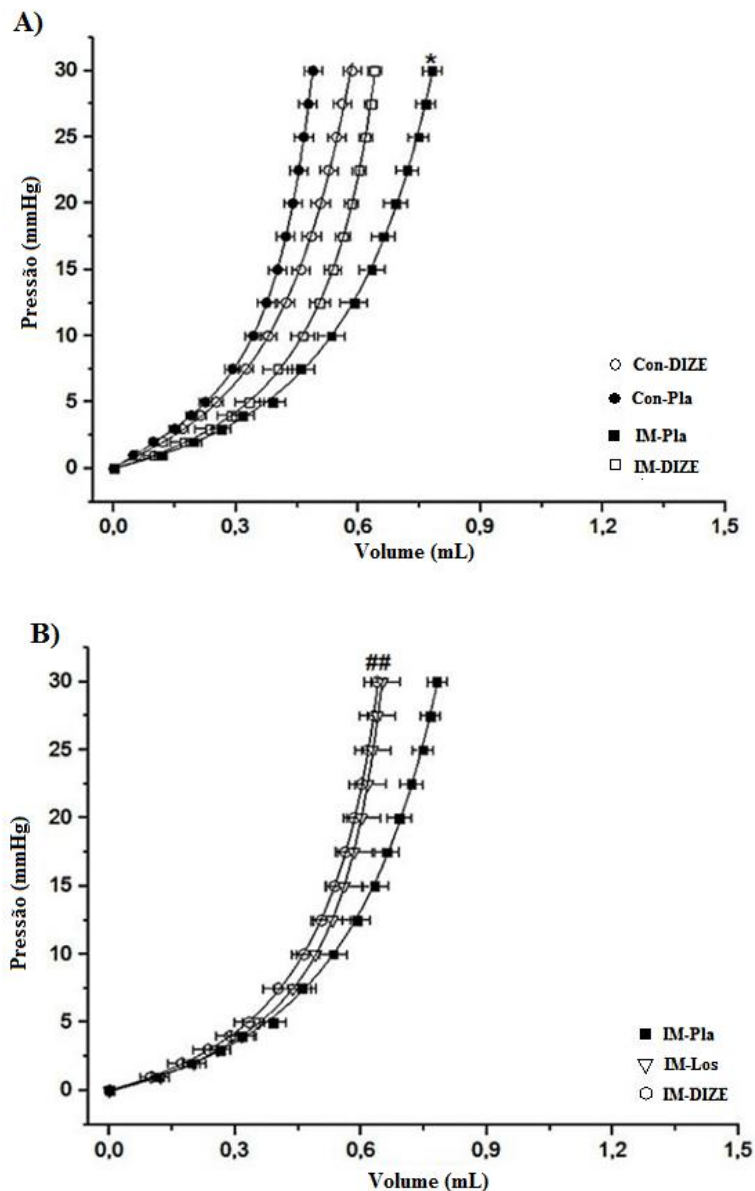


Figura 16. Curvas pressão volume (A e B) obtidas com o coração em assistolia 28 dias após o procedimento cirúrgico do IAM ou cirurgia fictícia. À esquerda está o gráfico dos grupos controles e infartados e à direita os gráficos de comparação dos três grupos infartados. Con-DIZE: Controle + DIZE; Con-Pla: Controle + Placebo; IM-Pla: Infarto do Miocárdio + Placebo; IM-DIZE: Infarto do Miocárdio + diminazene; IM-Los: Infarto do Miocárdio + Losartan. * $p < 0,05$ vs Con-DIZE e Con-Pla; # $p < 0,05$ IM-Pla

A figura 17 mostra o primeiro segmento da curva pressão-volume, no intervalo de 0 a 5 mmHg, ajustado para uma regressão linear. O índice de dilatação ventricular esquerda foi obtido através da inclinação da reta. Pode ser observado no gráfico à direita que a regressão referente aos grupos infartados (IM-DIZE: $0,33 \pm 0,03$ mmHg/mL; $n=7$; IM-Pla: $0,39 \pm 0,03$ mmHg/mL; $n=8$) tem menor inclinação comparado com os grupos controles (Con-Pla: $0,22 \pm 0,015$ mmHg/mL; $n=13$; Con-DIZE: $0,25 \pm 0,013$ mmHg/mL; $n=12$), indicando maior volume intraventricular.

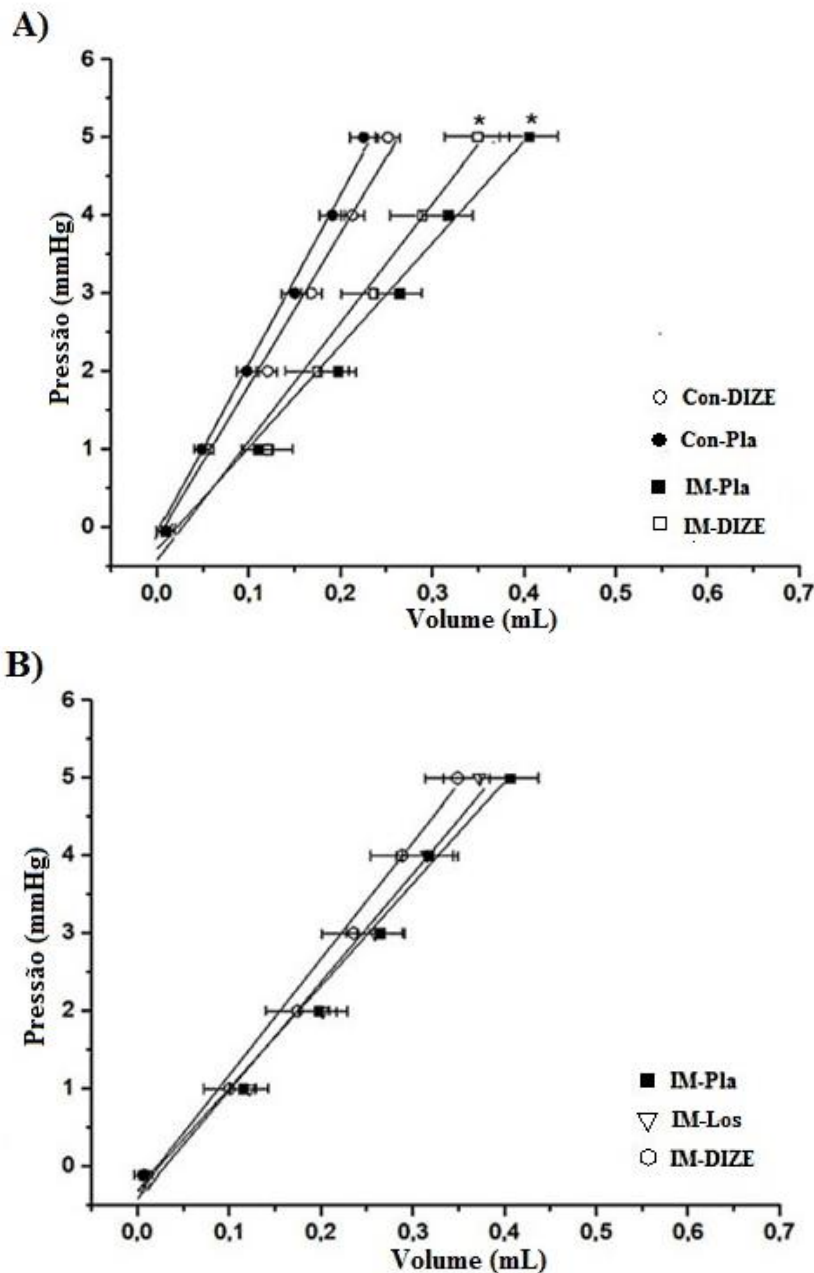


Figura 17. Curvas pressão volume (A e B) referente ao primeiro segmento da curva que é de 0-5 mmHg, obtidas com o coração em assistolia vinte e oito dias após o procedimento cirúrgico do IAM ou cirurgia fictícia do IAM. A direita está o gráfico dos grupos controles e infartados e a esquerda está o gráfico de comparação do grupo infartado, grupo controle positivo (IML) e o grupo submetido ao tratamento do DIZE. Con-DIZE: Controle + DIZE; Con-Pla: Controle + Placebo; IM-Pla: Infarto do Miocárdio + Placebo; IM-DIZE: Infarto do Miocárdio + diminazene; IM-Los: Infarto do Miocárdio + Losartan. * $p < 0,05$ vs Con-DIZE e Con-Pla.

Na figura 18 podemos observar a rigidez cardíaca que é representada pelo segundo segmento da curva que vai de 5 a 30 mmHg. Nota-se que a curva referente ao grupo IM-Pla teve um deslocamento para esquerda, porém o grupo tratado com DIZE melhorou a rigidez ventricular, pois a sua curva foi deslocada para direita apresentando valores semelhantes aos dos grupos controles Con-Pla ($7 \pm 0,2$ k2; $n=13$) e Con-DIZE. Em comparação com os três

grupos infartados nota-se que os animais tratados com DIZE foi capaz de reduzir essa rigidez mostrando valores próximos a do seu controle positivo IM-Los.

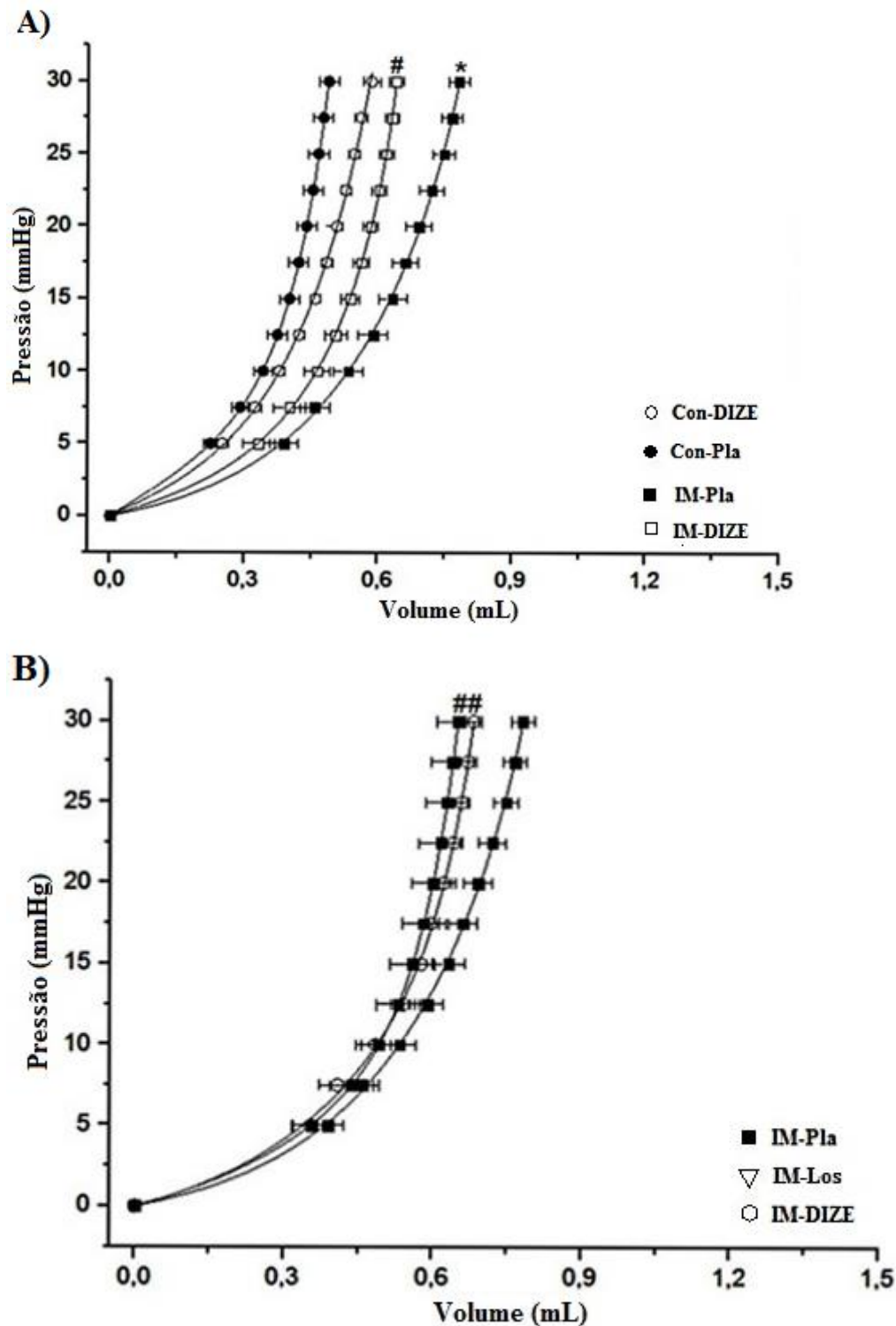


Figura 18. Curvas pressão volume com pressão (A e B) de 5-30 mmHg obtidas com o coração em assistolia vinte e oito dias após o procedimento cirúrgico do IAM ou cirurgia fictícia do IAM. A direita está o gráfico dos grupos controles e infartados e a esquerda está o gráfico de comparação do grupo infartado. Con-DIZE: Controle + DIZE; Con-Pla: Controle + Placebo; IM-Pla: Infarto do Miocárdio + Placebo; IM-DIZE: Infarto do Miocárdio + diminazene; IM-Los: Infarto do Miocárdio + Losartan. * $p < 0,05$ vs Con-DIZE e Con-Pla; # $p < 0,05$ vs IM-Pla

4.7 Colágeno

A área ocupada por colágeno no miocárdio remanescente foi exclusiva do ventrículo esquerdo. Houve um aumento expressivo na deposição de colágeno foi observado nos dois grupos infartados quando comparados com os grupos controles. Porém, nos animais tratados DIZE ou losartan houve menor deposição de colágeno em relação aos animais infartados e não tratados.

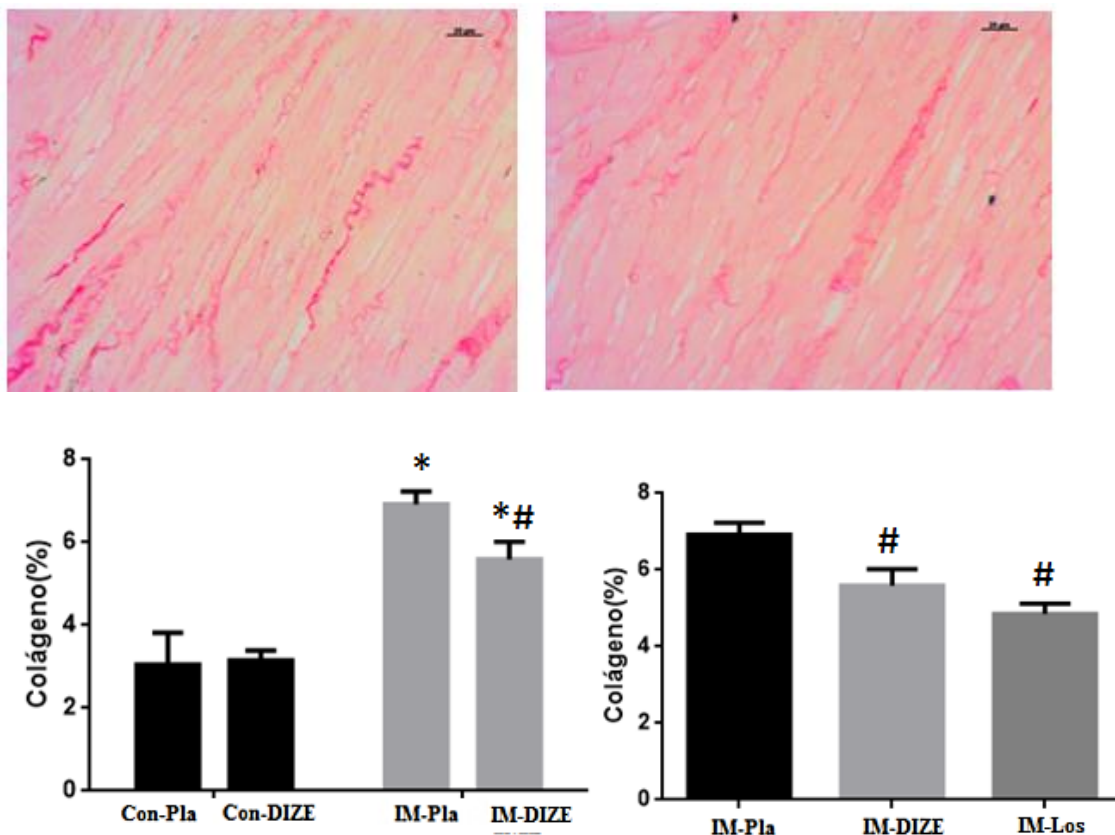


Figura 19. Avaliação da área ocupada por colágeno no miocárdio remanescente ao infarto após coloração com picrosirius red. Foram fotografados e analisados 6 campos para cada corte em aumento de 400 vezes. Con-DIZE: Controle + DIZE; Con-Pla: Controle + Placebo; IM-Pla: Infarto do Miocárdio + Placebo; IM-DIZE: Infarto do Miocárdio + diminazene; IM-Los: Infarto do Miocárdio + Losartan. * $p < 0,05$ vs Con-DIZE e Con-Pla; # $p < 0,05$ vs IM-Pla

4.8 Hipertrofia

A área de secção transversa dos miócitos foi exclusiva do ventrículo esquerdo se mostrou maior nos grupos infartados IM-Pla ($427 \pm 20 \mu\text{m}^2$; $n=8$) e IM-DIZE ($417 \pm 11 \mu\text{m}^2$; $n=10$) em relação ao grupo controle Con-Pla ($277 \pm 6 \mu\text{m}^2$; $n=8$) e CD ($292 \pm 11 \mu\text{m}^2$; $n=6$), não sendo

encontrada diferença significativa associada ao tratamento com DIZE. Em comparação com os três grupos infartados não houve diferença estatística significativa entre o grupo IM-Pla ($427 \pm 20 \mu\text{m}^2$; $n=8$) quando comparado ao grupo IM-DIZE ($417 \pm 11 \mu\text{m}^2$; $n=10$). Entretanto no grupo IM-Los ($400 \pm 16 \mu\text{m}^2$; $n=7$) a área média dos cardiomiócitos foi significantivamente menor que no grupo IM-Pla.

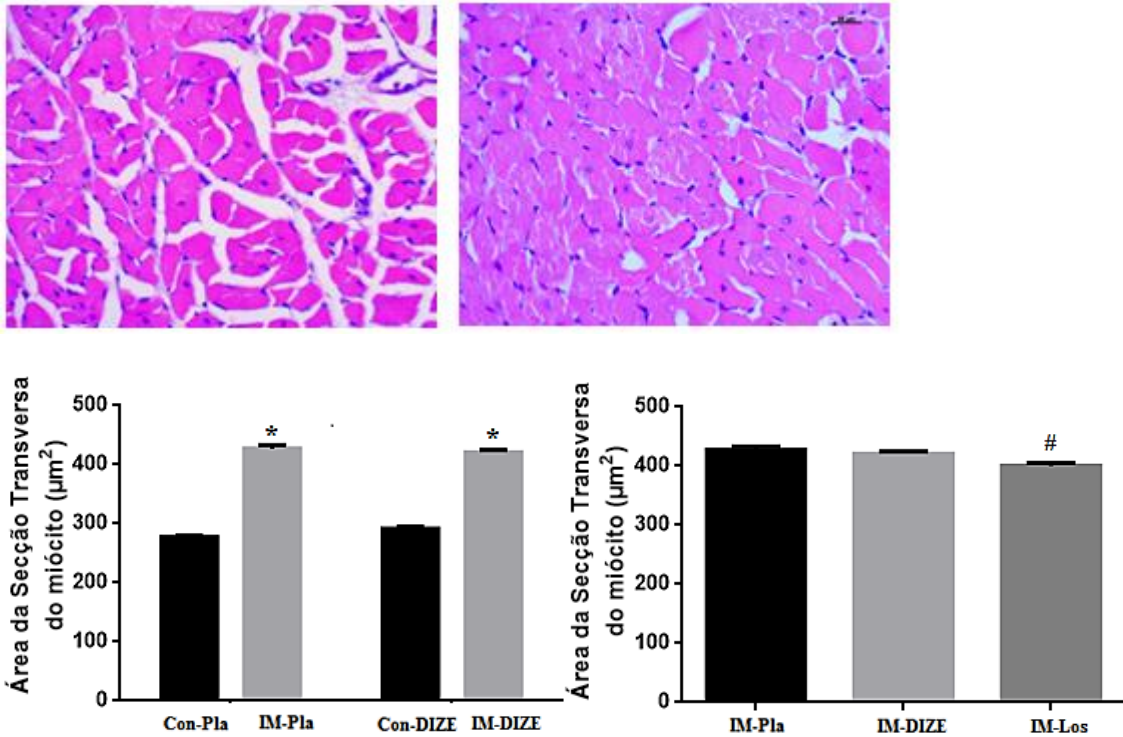


Figura 20. Avaliação da hipertrofia cardíaca pela medida da área de secção transversa do miócito em lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Foram fotografados e analisados 50 miócitos em cada corte, sob aumento de 400 vezes. Con-DIZE: Controle + DIZE; Con-Pla: Controle + Placebo; IM-Pla: Infarto do Miocárdio + Placebo; IM-DIZE: Infarto do Miocárdio + diminazene; IM-Los: Infarto do Miocárdio + Losartan. * $p < 0,05$ vs Con-DIZE e Con-Pla; # $p < 0,05$ vs IM-Pla

5. DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da mortalidade

Após o IAM têm-se o aumento da FC a fim de compensar a queda do débito cardíaco (DC). A perda de eficiência da contração ventricular leva a aumento da pressão de enchimento ventricular e isso tem sido associado com o aumento de mortalidade após o infarto (Diaz et al, 2005). Além disso, vários outros fatores que estão bem estabelecidos na literatura podem contribuir para a mortalidade pós-isquemia cardíaca; como a disfunção hemodinâmica do VE com queda da PSVE, $dp/dt+$ e $dp/dt-$; aumento da PDFVE, bem como, hipertrofia cardíaca e fibrose intersticial excessiva no miocárdio remanescente ao infarto. Ademais da disfunção hemodinâmica, a mortalidade está associada também com a extensão da área de infarto, sendo mais evidente quando a área infartada é igual ou superior a 40% (Pfeffer et al 1985). Em nosso estudo a média da área de infarto foi de 43%, isso contribui para redução da função cardíaca e risco de ruptura do VE, portanto os nossos animais infartados apresenta índice de mortalidade de 32%, ficando dentro do esperado devido à disfunção hemodinâmica e a impactante área infartada (figura 12).

Na literatura está descrito que o losartan é capaz de reduzir a mortalidade após isquemia cardíaca. Rocher-Giudicelli et al. (1997) demostram que a administração de irbesartana aumentou a sobrevida de ratos submetidos ao IAM, de maneira dose dependente. Dahlöf et al. (2002) realizaram um estudo em humanos comparando o losartan com o atenolol e observaram que o grupo tratado com losartan em relação à mortalidade cardiovascular, acidente vascular encefálico e mortalidade total, houve redução de risco de 13%, 25% e 10%, respectivamente. Porém a literatura é controversa, Hu et al. (1998) não evidenciaram efeito protetor do losartan na mortalidade de ratos, submetidos a oito semanas de tratamento, após IAM. E nos nossos achados não encontramos diferenças estatística entre os tratamento com DIZE (16%), losartan (5%) e Placebo (32%), apresentando um $p < 0,065$. A mortalidade é um importante desfecho a ser analisado quando uma nova terapia é estudada no tratamento de doenças crônicas. No entanto, é previsto que qualquer tratamento que melhore a função cardíaca após o IAM, reduza a taxa de mortalidade e aumente a sobrevida.

5.2 Parâmetros Morfométricos

O processo de remodelamento no infarto é evidenciado por aumento da cavidade ventricular. Na fase aguda a dilatação ventricular é decorrente do processo de expansão do infarto, enquanto que na fase crônica a dilatação é decorrente do processo de hipertrofia excêntrica. Nesse processo acontecem importantes alterações da matriz extracelular cardíaca, destacando-se o aumento de colágeno. Além disso, têm-se alterações no tamanho e massa do coração (Zornoff et al., 2008). Cronicamente, além da dilatação ventricular o remodelamento é caracterizado também por aumento do átrio esquerdo, frações de ejeção baixas, queda do débito cardíaco já em condições basais, e presença de congestão pulmonar. A capacidade do ventrículo esquerdo em bombear o sangue sob pressões adequadas está relacionada com a quantidade de tecido conectivo envolvido no remodelamento após o IAM (Pfeffer et al., 1979). A necrose da área isquêmica causa perda tecidual no ventrículo esquerdo e um processo de restauração é iniciado rapidamente, a fim de reestabelecer a função ventricular. (Sun & Weber, 2000).

Em nosso estudo, após 28 dias do IAM, foi possível observar remodelamento ventricular nos animais infartados que receberam placebo, onde evidenciamos aumento do peso do pulmão e hipertrofia do VD sem alteração da massa absoluta e relativa do VE, desta forma corroborando com os demais trabalhos produzidos neste laboratório (Mill et al., 1991 e 1997). A massa absoluta e relativa do VE não sofreu mudança significativa, mostrando desta maneira que os miócitos remanescentes apresentaram hipertrofia que sobrepujou a área perdida pela necrose miocárdica, uma vez que a espessura e consequentemente a massa da área de formação de fibrose é menor que a do músculo original. Esse crescimento muscular foi compensatório, sugerindo, que a hipertrofia não se deve apenas ao estímulo mecânico da elevação da pré-carga ou da pós-carga (Bolognese & Cerisano, 1999), mas também pode ocorrer devido a estímulos locais, via estiramento e ativação de mecanotransdutores, associado à reação inflamatória decorrente de necrose dos miócitos, que promovem a liberação de fatores de crescimento que estimulam a hipertrofia e fibrose (Sadoshima & Izumo, 1993; Suzuki Y., 2003).

A hipertrofia do VE é diretamente relacionada à área do infarto. Nosso achados estão alinhados com os dados apresentados por Mill et al. (1991) em estudo morfométrico do coração de ratos com infarto de média extensão, mostrando que o crescimento hipertrófico no VE infartado é suficiente para recuperação quase que completa da massa de VE.

Nossos resultados apontaram hipertrofia de ventrículo direito em animais infartados tratados com placebo, onde observamos aumento da massa absoluta e relativa do VD. Esse aumento

poderia ser atribuído a dois fatores: 1) a estimulação mecânica desencadeada pela hipertensão pulmonar e; 2) a ativação do sistema neuro-hormonal sistêmica ou local (Anversa P et al., 2000). Após o infarto agudo do miocárdio, frequentemente, ocorrem diferentes graus de disfunção diastólica do ventrículo esquerdo. Em consequência dessa disfunção, ocorre congestão pulmonar com aumento da pressão capilar no órgão e consequente sobrecarga do ventrículo direito levando à hipertrofia dos miócitos. Esta hipertrofia também poderia ser dependente da ação trófica dos mediadores neuro-hormonais liberados após o infarto agudo do miocárdio, como a própria angiotensina II, que ao acoplar aos receptores específicos, ativa mediadores intracelulares que promovem a expressão de proto-oncogêneses promotores da síntese proteica (Unger T., 1996; Lorell BH, 1999). A hipertrofia de VD é um indicativo da instalação e evolução da insuficiência cardíaca (IC) (Davidoff et al., 2004; Pererira et al., 2005).

Vários estudos têm mostrado o surgimento da hipertrofia ventricular direita em fase tardia, com três semanas após infarto (Pffefer et al. 1985; Anversa et al., 1984; Afzal & Dhalla, 1992; Nahrendorf et al., 2003). Desta forma, nossos achados corroboram com esse conceito, pois encontramos hipertrofia de VD no grupo IM-Pla com quatro semanas após a isquemia cardíaca.

No presente trabalho, observamos que o tratamento com DIZE após IAM foram eficazes em prevenir, ainda que parcialmente a hipertrofia do VD (tabela 1). O losartan também foi capaz de atenuar a hipertrofia do VD (tabela 2). Muito provavelmente essas drogas atenuaram o grau de congestão pulmonar nos ratos infartados que se traduz neste protocolo na redução da porcentagem de água nos pulmões. Este achado corrobora com estudo realizado por Vinayak S et al. (2013), que observou redução da hipertrofia do VD em animais com hipertensão pulmonar tratados com DIZE. A redução da hipertrofia do VD em nosso estudo pode ter ocorrido mediante a ativação de ECA2 com consequente aumento de Ang 1-7. Estudo realizado com ratos Sprague-Dawley com hipertrofia ventricular direita induzida por bleomicina apresentou menor hipertrofia nos ratos que superexpressaram a Ang-(1-7) ou a ECA2. Por outro lado, a deleção do gene da ECA2 impede que tais efeitos benéficos se manifestem em modelos de estudo de cardiopatias (Shenoy et al., 2010). Os efeitos benéficos do DIZE também podem ser devidos à sua ação na prevenção do desequilíbrio do SRAA e devido a modular várias citocinas pró-inflamatórias associada com lesão (YanFai Qui et al., 2013). Desta forma, podendo explicar em parte nosso resultado obtido pelo tratamento farmacológico com DIZE.

Resultados semelhantes aos obtidos em nosso estudo com tratamento com losartan foram evidenciados por outros autores (Mulder P et al., 1997; Ambrose et al., 1999) que observaram redução da massa ventricular em corações infartados de ratos tratados com inibidor da ECA ou com antagonista de receptores AT1. Quando comparado os três grupos infartados, o grupo que recebeu o tratamento com losartan teve redução na massa absoluta e relativa do VD, quando comparado aos grupos IM-Pla e IM-DIZE, além de redução da porcentagem de água no pulmão nos grupos IM-Los e IM-DIZE. Desta forma, o losartan mostrou-se mais eficiente para redução de congestão pulmonar e, conseqüentemente, diminuição da progressão de IC.

5.3 Medidas Hemodinâmicas- Ventrículo Esquerdo

O desequilíbrio no SRAA, resultante da isquemia cardíaca, aumenta a atividade do eixo (ECA/AngII/AT1) causando vasoconstrição, apoptose, liberação de aldosterona, disfunção endotelial, proliferação/hipertrofia, fibrose, arritmia, estímulo do sistema nervoso simpático, trombótico. E aumento da atividade do eixo (ECA2/Ang1-7/Mas) induz vasodilatação, produção NO, inibe a ativação de ERK1/2 tendo efeito angiogênico, antiproliferativo, antitrombótico e é cardioprotetor na isquemia cardíaca e insuficiência cardíaca (Carey et al., 2003; Chung et al., 1998; Dostal & Baker, 1999; Brosnihan et al., 1998; Tschope et al., 2002; Donoghue et al., 2000) . A expressão da ECA2 aumenta na fase inicial do infarto atuando como mecanismo compensatório. No estágio de IC sua expressão diminui significativamente (Sumit K et al., 2010).

Esse desequilíbrio do SRAA contribui para disfunção hemodinâmica após IAM, desta forma, elevando a PDFVE e a diminuição $dP/dt+$, $dP/dt-$ estão deteriorados no VE tanto precocemente como cronicamente após o IAM (Saito et al., 2003; Sartorio et al., 2005; Faria et al., 2011, DeFelice et al., 1989; Mill et al., 2003). Pesquisas mostram que incrementos na PDFVE estão linearmente associados a variações na extensão do infarto, mostrando que em infartos extensos há aumento expressivo na PDFVE (Pfeffer et al., 1979; Saraiva et al., 2007; Santos et al., 2009). Nossos dados corroboram essa ideia, mostrando níveis bastante elevados de PDFVE após o infarto, além de redução da $dP/dt+$, $dP/dt-$. Esses parâmetros foram melhorados pelo tratamento com DIZE e efeitos semelhantes de melhoras nos parâmetros hemodinâmicos foram causados pelo losartan. O favorecimento dos parâmetros hemodinâmicos causados pelo DIZE pode ter ocorrido pelo aumento da atividade catalítica da ECA2, que vai aumentar os níveis de ang1-7, desta forma, pode atuar como *feedback* positivo.

Entretanto, as melhoras produzidas pelo losartan se deve a inibição do receptor AT1, impedindo a ligação da ang II, com maior acúmulo de angII, podendo ser convertida para ang1-7, o que vai contribuir para a melhora a hemodinâmica dos animais (Wanga X et al., 2016; Kulemina & Ostrov, 2011). Essa capacidade de produção de ang 1-7 pelos dois tratamentos explica em partes a semelhança na melhora hemodinâmica após isquemia cardíaca.

A superexpressão da ECA2 pode melhorar a função cardíaca (Der Sarkissian et al., 2008; Zhao et al., 2010) e a deficiência dessa proteína traz prejuízo na pressão arterial sistólica (Bodiga et al., 2011), na contratilidade e no relaxamento do ventrículo esquerdo (Oudit et al., 2007; Yamamoto et al., 2006). Além disso, foi demonstrado que a superexpressão de Ang1-7 no coração aumentou significativamente a função contrátil do ventrículo esquerdo quando comparado com animais controle (Ferreira et al., 2010). Este benefício também foi demonstrado em condições patológicas, onde a infusão de Ang1-7 foi capaz de prevenir a disfunção cardíaca em modelo de infarto do miocárdio, impedindo a diminuição da pressão sistólica e o aumento da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (LOOT et al., 2002). Em modelo de isquemia/reperfusão, a Ang1-7 melhorou a função contrátil miocárdica após o período de isquemia em corações isolados de ratos (Ferreira et al., 2002).

Além disso, após o IAM os níveis citocinas pró-inflamatórias; tais como a IL-1 β e TNF- α são elevados, contribuir para o desenvolvimento e progressão de lesão isquêmica (Testa M et al., 1996; Torre-Amione G et al., 1996). O eixo ECA2 / Ang1-7 / Mas possui uma função anti-inflamatória (Ferrario CM et al., 2005). Pesquisas realizadas por YanFei Qi et al. (2013), observou que o DIZE é capaz de impedir o aumento nas citocinas pró-inflamatórias, e células de macrófagos, esse composto tem importância na influenciar de muitos eventos patológicos, de forma direta e indireta. A superexpressão de Ang1-7 e tratamento com DIZE diminui citocinas pró-inflamatórias pulmonares em modelos de doença pulmonar (Shenoy V et al., 2010; Shenoy V et al., 2013) Essa descoberta pode explicar em partes as melhoras hemodinâmicas causadas pelo DIZE.

Em síntese, nossos achados tanto com tratamento com DIZE quanto com tratamento com Losartan foram capazes de melhorar de forma semelhante às funções hemodinâmicas do VE após IAM.

5.4 Medidas Hemodinâmicas- Ventrículo Direito

O VD tem como função bombear o sangue para os pulmões a fim de realizar trocas gasosas, possui uma camada muscular menor que a do VE e encontra-se menos envolvido em doenças. Em algumas patologias cardiovasculares as alterações no VD são consideradas como consequência da doença tendo um papel secundário (Campana et al, 2004; Voelkel et al 2006). Sabe-se que o aumento da pressão de enchimento do VD está associado a sinais de deterioração ventricular e de redução da sua contratilidade (Campana et al, 2004).

A disfunção do VE tem como consequência a vasoconstrição arterial pulmonar, sobrecarga e hipertrofia do ventrículo direito, com consequente aumento da pressão do VD. A insuficiência do VE após isquemia cardíaca está associada com a elevação da pressão do VD e hipertrofia do VD (Anversa et al, 1985). Quando a pressão de enchimento do VE se eleva, a pressão sistólica do VD aumenta para manter o gradiente de pressão para o leito pulmonar. Em experimentos com ratos com IC, nota-se hipertrofia de VD acompanhada com aumento da PDFVE (Norman & Coers., 1960 Pfeffer 1979). A disfunção ventricular direita ocasionada em decorrência da insuficiência ventricular esquerda crônica leva à inabilidade na manutenção do fluxo de sangue requerido para manter adequadamente a pré-carga do ventrículo esquerdo. Fica evidente que a função ventricular direita pode se tornar a via final na progressão da IC sendo esta função uma indicadora bem sensível de pior diagnóstico após o infarto do miocárdio (Voelkel et al., 2006).

Em nossos achados foi observado no grupo IM-Pla aumento da PDFVE e hipertrofia do VD e aumento da PSVD quando comparados aos grupos controles, podendo ser indicativo de IC. Porém o tratamento com DIZE apresentou redução da pressão do VD, não mostrando diferença estatística com os grupos controles (Con-Pla e Con-DIZE) e quando comparado os grupos infartados tanto o DIZE quanto o losartan não foram capazes de reduzir a pressão do VD (figura 14). Rigatto et al. (2013), mostrou que o DIZE foi capaz de diminuir a pressão sistólica do VD e mostrou melhora no equilíbrio do sistema nervoso autônomo, assim podendo diminuir a remodelamento do VD.

Além disso, nossos achados mostra aumento da $dp/dt-$ do VD em animais infartados e tratados com placebo, tanto o DIZE quanto o losartan foram capazes de reduzir esse parâmetro quando comparado com o grupo IM-Pla. Em estudo realizado com animais com hipertensão pulmonar e que foram tratados com DIZE, apresentou melhora no parâmetro de $dp/dt-$ quando comparado com o animal com hipertensão pulmonar sem ser submetido a qualquer tratamento (Vinayak S., 2012)

Entretanto, o DIZE, como um ativador de ECA2, que aumenta a produção de ang1-7 via receptor Mas pode promover angiogênese. Além disso, a ang1-7, também tem sido

evidenciada com ação na modulação e função da hematopoiese de células progenitoras (Heringer WS et al., 2009; Wang Y et al., 2010). YanFei Qi. (2013) observou em ratos infartados aumento de CPCs (do inglês endothelial progenitor cells) na área peri-infartada do coração isquêmico, e aumento circulante de EPCs (do inglês cardiac progenitor cells), e restauração da densidade capilar, nos quais estão correlacionados com uma melhoria da função cardíaca tanto do VD quanto do VE.

5.5 Curva Pressão Volume

O processo de remodelamento ocorre como uma resposta adaptativa, que se manifesta clinicamente por alteração no tamanho, na massa, na geometria e na função do coração, tendo como objetivo de manter a função da bomba cardíaca (Pfeffer & Braunwald, 1990). A presença de segmentos da parede com material não contrátil gera uma sobrecarga para as áreas remanescentes da câmara cardíaca, o que induz hipertrofia com padrão excêntrico nessas regiões que, acompanhada do deslizamento de fileiras de miócitos, leva ao aumento volumétrico da câmara. O processo de remodelamento é influenciado por estresse mecânico, resposta inflamatória, ativação neurohumoral e ativação de metaloproteinases de matriz celular.

Nossa análise da relação pressão-volume mostrou dilatação ventricular excessiva nos animais vinte e oito dias após o infarto, evidenciado pelo desvio da curva para a direita tanto para dilatação quanto para rigidez (maior volume) - (figuras 16, 17 e 18). A dilatação está relacionada a expansão ventricular devido a extensa área do infarto, estando associada a um pior prognóstico (Norris et al., 1992; Nijland et al., 2002). Fletcher et al. (1985) mostraram a relação entre a extensão do infarto e a dilatação ventricular esquerda em ratos. Além disso, a dilatação ocorre de forma progressiva, sendo iniciada nos primeiros dias seguidos ao infarto (Moro et al., 2007). Em nosso trabalho, o tratamento com DIZE e o tratamento com Losartan obteve menor dilatação e consequente menor expansão ventricular. Informações na literatura sobre o DIZE é bem escasso, porém YanFei QI et al. (2013) encontrou em seu estudo diminuindo o tamanho do infarto e apoptose, assim podendo reduzir a dilatação ventricular causada pelo IAM.

Palojoki et al. (2001) mostraram que a apoptose na área remanescente ao infarto está vinculado a deterioração da função ventricular e progressão da insuficiência cardíaca. Além disso, aumento da taxa de apoptose na área remanescente ao infarto está diretamente ligada ao

desenvolvimento de insuficiência cardíaca após IAM em ovelhas (Jiang et al., 2003). Assim, um possível efeito anti-apoptótico relacionado diretamente no coração efeito sobre menor gasto metabólico, estabilização e preservação da função mitocondrial, redução da hiperatividade adrenérgica ou indiretamente com menor estresse hemodinâmico ao aumento de ECA 2 ou ao bloqueio do R-AT1 pode explicar parcialmente os nossos achados.

Além disso, Yamagishi et al. (1993) mostraram a participação da Ang II agindo pelo seu receptor AT1 levando a dilatação ventricular após o infarto. Descrições similares foram feitas por Nishikimi et al. (1995) mostrando a participação do sistema renina angiotensina na dilatação ventricular e na progressão para a insuficiência cardíaca após isquemia cardíaca em ratos. Os receptores para Ang II são expressos precocemente após isquemia cardíaca (Sun & Weber, 1994). A expressão gênica para o receptor AT1 encontra-se aumentada expressivamente com apenas 24 horas após a oclusão coronariana. Portanto na região não infartada, esse aumento foi identificado com apenas uma semana após a isquemia cardíaca (Nio et al., 1995). Além disso, camundongos com superexpressão cardíaca de Ang II apresentam grande dilatação ventricular após IAM (Xu et al., 2007).

O colágeno ocupa aproximadamente 3% do volume miocárdio, representando o principal componente responsável pela rigidez das câmaras cardíacas. Vista disso, mudanças tanto no conteúdo como na distribuição do colágeno estabelece grandes alterações nas propriedades passivas da parede miocárdica (Robinson et al., 1988). Na curva referente à rigidez podemos observar um deslocamento a direita no grupo de animais infartados sem qualquer tratamento farmacológico, além disso, têm-se aumento do colágeno (figura 16 e figura 19) o que contribui para essa rigidez da câmara ventricular. Os animais tratados com losartan e tratados com DIZE apresentou redução na rigidez deslocando a curva para esquerda e diminuição na deposição de colágeno, evidenciadas nos resultados nas figuras 16 e 19. Estudo realizado com DIZE em animais infartados mostra preservação na função cardíaca e atenua a remodelamento cardíaca após IAM, o que corrobora com nossos achados. Os efeitos benéficos do DIZE pode ser resultado da possível prevenção do desequilíbrio do SRA, que pode ter ocorrido possivelmente por aumento dos níveis de ang 1-7 que possui efeitos pró-inflamatórios, que foi evidenciado por YanFei Qi., (2013) após isquemia cardíaca, o DIZE foi capaz de reduzir citocinas pró-inflamatórias associada com lesão produzida pelo IAM.

5.6 Colágeno

Mediante a oclusão da artéria coronária, o colágeno é intensamente degradado na região infartada por células inflamatórias infiltradas no miocárdio infartado e com a progressão das alterações cardíacas a deposição de colágeno é aumentada no miocárdio remanescente (Fishbein et al., 1978; Cannon et al., 1983; Vanhoutte et al., 2006; Leite et al., 1995; Mill et al., 2003). Observamos em nosso estudo, semelhante ao descrito por outros autores, um aumento bastante significativo no conteúdo de colágeno no miocárdio remanescente ao infarto, evidenciado na figura 19 dos resultados. Esse excesso de colágeno contribui para o déficit da contratilidade e do relaxamento miocárdico observado em nosso estudo (figura 13), além de favorecer a disfunção diastólica e a progressão para a insuficiência cardíaca. A Ang II quando ligada ao RAT1 em fibroblastos é um contribui para o processo de deposição excessiva de colágeno no tecido remanescente ao infarto (Sun et al., 1995; Wilke et al., 1996; El-Sabban et al., 2000; Zornoff et al., 2000). Busatto et al. (1997) evidenciou no miocárdio remanescente de ratos infartados aumento da atividade da ECA, que é o principal substrato da Ang I para formação de Ang II. Dados semelhantes foram relatados por vários autores (Schieffer et al., 1994; Mill et al., 1997; Resende et al., 2006). Sun et al. (1996) observaram o aumento na expressão da ECA em miofibroblastos três dias após o infarto, com consequente aumentando a deposição de colágeno. A estimulação dos receptores AT1 pela Ang II induz diversos efeitos no coração, dentre eles a proliferação de colágeno (Crabos et al., 1994; Iwami et al., 1996). Ju et al. (1997) mostraram aumento progressivo do colágeno na área viável após o infarto, sendo revertido após bloqueio dos receptores AT1, evidenciando os efeitos pró-fibroticos mediados pela Ang II. Esse achado corrobora com o nosso resultado, que o bloqueio do RAT1 foi capaz de reduzir a deposição de colágeno (figura 19).

A área do miocárdio remanescente ao infarto ocupada por colágeno, excluindo as áreas de transição, foi avaliada em cortes transversais do ventrículo esquerdo corados com picrosirius. Um aumento expressivo na deposição de colágeno foi observado nos dois grupos infartados (IM-Pla e IM-DIZE) quando comparados com os grupos controles. Porém os animais submetidos ao tratamento farmacológico com Dize e o tratamento com losartan reduziram parcialmente a deposição de colágeno quando comparado ao IM-Pla. Isso possivelmente ocorreu, pois segundo a literatura o DIZE atua no eixo ACE2 / Ang- (1-7) / Mas e possui uma função anti-inflamatória. Em pesquisa realizada o DIZE foi capaz de impedir o aumento de citocinas pró-inflamatórias, e células de macrófagos (YanFei Qi et al., 2013). O losartan também apresenta efeitos pró-inflamatórios, devido a sua inibição sobre o R-AT-1, contribuindo para a ligação da Ang II, sobre o R-AT-2, além de aumentar os níveis de Ang 1-

7, ambos com ação pró-inflamatória (YanFei Qi et al., 2013; Campbell et al., 1995; Kabour et al., 1994)

5.7 Hipertrofia

A hipertrofia ventricular é uma resposta adaptativa que ocorre após o IAM com o propósito de compensar a sobrecarga hemodinâmica, atenuar a dilatação ventricular e estabilizar a função contrátil. A sobrecarga hemodinâmica produzida após isquemia cardíaca, ativa alguns mecanismos compensatórios, dentre eles o mecanismo de Frank-Starling para aumentar a formação de pontes cruzadas, o aumento da massa ventricular para compensar a carga adicional, e a ativação neuro-humoral. O mecanismo de Frank-Starling é limitado nessas condições de perda excessiva de tecido contrátil (Mill et al., 1990). A ativação do sistema nervoso simpático contribui para hipertrófica cardíaca e exerce efeitos deletérios diante da ativação crônica (Marano et al., 2002), assim, inicialmente o aumento na massa ventricular desempenha um papel crítico na compensação hemodinâmica após o infarto.

Vinte e oito dias após o infarto, os animais apresentaram grande aumento da área de secção transversal do miócito, porém sem efeito significativo associado ao tratamento com DIZE, somente o losartan atenuou o grau de hipertrofia adaptativa pós-IAM, quando comparado ao grupo IM-Pla (figura 20). Apoiando nossos resultados, outros autores identificaram diminuição do processo hipertrófico, após o infarto, com bloqueadores de receptores AT1 (Schiefer B et al., 1994; Taylor K., 1998)

A redução de hipertrofia causada pelo grupo de animais tratados com losartan, pode ter ocorrido devido a inibição dos receptores AT1 nos miócitos impedindo a ligação da AngII. Tais receptores, quando estimulados, ativam a fosfolipase C com consequente formação de diacilglicerol e IP3 (trifosfato de inositol). O diacilglicerol estimularia o crescimento celular, via ativação da fosfoquinase C, enquanto o IP3 aumentaria os níveis de Ca^{2+} livre no citosol (Griedling KK., 1992), desta forma a AngII contribui para o processo de hipertrofia direta no coração, independente de alterações hemodinâmicas. Pesquisas realizadas por Griedling KK. (1986 e 1986) corrobora com esta afirmativa que observou efeito hipertrófico desse peptídeo em cultura de miócitos, Entretanto, a hipertrofia após IAM é multifatorial e o DIZE em nossos achados não foi capaz de reduzir de forma significativa à hipertrofia intersticial (figura 19).

Dentre a multifatorialidade a ativação neurohumoral (sistema renina-angiotensina-aldosterona e a hiperatividade simpática) tem grande ação hipertrofia cardíaca. Isso pode ser evidenciado quando a superexpressão de Ang II no coração induziu hipertrofia cardíaca independente de outros efeitos sistêmicos relacionados (Xu et al., 2007). Além disso, a superexpressão do receptor AT1 em miócitos induz hipertrofia e remodelamento ventricular em camundongos (Paradis et al., 2000). Importante ressaltar que esses efeitos acontecem de forma independente dos efeitos sistêmicos associados aos componentes do sistema (Ainscough et al., 2009).

Alguns hormônios tem forte ação hipertrófica no miocárdio lesado. Um deles é a aldosterona, que exibe forte efeito hipertrófico sobre o miocárdio. Okoshi et al. (2004) mostraram em cardiomiócitos em cultura que a aldosterona induz hipertrofia. Os níveis de aldosterona estão elevados após o infarto, assim como a expressão do seu receptor no ventrículo esquerdo. A endotelina é outro fator que tem os níveis aumentados precocemente após o infarto e na insuficiência cardíaca (Stewart et al., 1991). Diante disso, podemos esperar que outros fatores como os citados acima possam responder, em parte, por esse efeito hipertrófico observado nos dois grupos infartados (IM-Pla e IM-DIZE).

5.8 Efeitos tóxicos

Finalmente, é pertinente salientar que usamos o DIZE a partir de descrições prévias da literatura de sua capacidade de ativar a ECA-2. Porém em alguns estudos o DIZE apresentou efeitos tóxicos como hiperestesia, salivação, convulsões intermitentes, micção frequente e defecação, prurido e sudorese, danos nos rins e fígado (Homeida AM et al., 1981; Sharma SP et al., 1984). Pode ser que a molécula do DIZE não seja farmacodinamicamente ideal para estudos clínicos. No entanto, o estudo é relevante na medida em que fornece evidência de que o DIZE tem efeito que potencialmente poderiam ser decorrentes do aumento da produção de Ang 1-7 e/ou da diminuição da Ang II.

6. CONCLUSÕES

Conclui-se que tanto o tratamento com DIZE quanto com o losartan teve um efeito redutor a hipertrofia do VD e a congestão pulmonar. Nos parâmetros hemodinâmicos do VE houve melhora de forma semelhante (DIZE e losartan), as funções hemodinâmicas da PSVE, PDF, dp/dt^- e dp/dt^+ . Porém parâmetros hemodinâmicos do VD o tratamento com DIZE foi mais eficaz, quando comparado com o losartan, na redução da pressão do VD e ambos (DIZE e losartan) tiveram resposta semelhante na melhora da função dp/dt^- . Com relação a deposição de colágeno tanto o DIZE quanto o losartan foram capazes de reduzir a deposição de colágeno na área remanescente ao infarto. Porém o losartan apresentou-se mais eficiente na redução de hipertrofia na área remanescente do VE.

7 REFERÊNCIAS

- AFZAL, N & DHALLA, N. S. Differential changes in left and right ventricular SR calcium transport in congestive heart failure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v. 262, n. 3 Pt 2, p. H868-H874, 1992.
- AINSCOUGH JFX, DRINKHILL MJ, SEDO A, TURNER NA, BROOKE DA, BALMFORTH AJ, BALL SG. Angiotensin II type-1 receptor activation in the adult heart causes blood pressure-independent hypertrophy and cardiac dysfunction. **Cardiovasc Res.** v. 81, n. 3, p. 592-600, 2009.
- AMBROSE, J; PRIBNOW, D. G; GIRAUD, F. D; PERKINS, K. D; MULDOON, L; GREENBERG, B. H. Angiotensin type 1 receptor antagonism with irbesartan inhibits ventricular hypertrophy and improves diastolic function in the remodeling post-myocardial infarction ventricle. **J Cardiovasc Pharmacol.** v. 33, n. 3, p. 433-439, 1999.
- ANVERSA, P; BEGHI, C; MCDONALD; S. L; LEVICKY, V; KIKKAWA, Y; OLIVETTI, G. Morphometry of right ventricular hypertrophy induced by myocardial infarction in the rat. **American Journal of Pathology.** v. 116, p. 504-513, 1984.
- ANVERSA, P; LERI, A; LI, B; LIU, Y; DI, SOMMA. S; KAJSTURA, J. Ischemic cardiomyopathy and the cellular renin-angiotensin system. **J Heart Lung Transplant.** v. 19, n. 8, p. S1-S11, 2000.
- ATLAS, S. A. The renin-angiotensin system revisited: classical and nonclassical pathway of angiotensin formation. **Mt Sinai J Med.** v. 65, n. 2, p. 87-96, 1998.
- BALDI, A; ABBATE, A; BUSSANI R, PATTI. G; MELFI, R; ANGELINI A; DOBRINA, A; ROSSIello, R; SILVESTRI, F; BALDI, F; DI, SCIASCIO. G. Apoptosis and post-infarction left ventricular remodeling. **J Mol Cell Cardiol.** v. 34, p. n. 2, 165-174, 2002.
- BALDO, M. P; DAVEL, A. P; NICOLETTI-CARVALHO, J. E; BORDIN, S; ROSSONI, L. V; MILL, J. G. Granulocyte colony-stimulating factor reduces mortality by suppressing ventricular arrhythmias in acute phase of myocardial infarction in rats. **J Cardiovasc Pharmacol.** v. 52, n. 4, p. 375-380, 2008.
- BOLOGNESE, L & CERISANO, G. Early predictors of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. **Am Heart J.** v. 138, n. 2 Pt 2, p. S79-S83, 1999.
- BUSATTO, V. C; CICILIN, M; MILL, J. G. Increased angiotensin-converting enzyme activity in the left ventricle after infarction. **Brazilian journal of medical and biological research.** v. 30, n. 5, p. 679-87, 1997.
- BUJAK, M & FRANGOGIANNIS, N. G. The role of TGF- β signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. **Cardiovasc Res.** v. 74, n. 2; p. 184-195, 2007.
- BROSNIHAN, K. B; LI, P; TALLANT, E. A; FERRARIO, C. M. Angiotensin-(1-7): A Novel Vasodilator of the Coronary Circulation. **Biol Res.** v. 31, n. 3, p. 227-234, 1998.

BROWER, G.L; GARDNER, J. D; FORMAN, M. F; MURRAY, D.B; VOLOSHENYUK, T; LEVICK, S. P; JANICKI, J. S. The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. **Eur J Car Thor Surg.** v. 30, n. 4, p. 604-610, 2006.

BRUM, P. C; ROLIM, N. P; BACURAU, A. V; MEDEIROS, A. Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors. **An Acad Bras Cienc.** v. 78, n. 3, p. 485-503, 2006.

BRUNTON, L. L; LAZO, J. S; PARKER, K. L. GOODMAN & GILMAN. Bases farmacológicas da terapêutica. 12^a Ed. Rio de Janeiro. McGraw-Hill, 2012.

CAMPANA, C; PASOTTI, M; MONTI, L; REVERA, M; SERIO, A; NESPOLI, L; MAGRINI, G; SCELISI, L; GHIO, S; TAVAZZI, L. The evaluation of right ventricular performance in different clinical models of heart failure. **European Heart Journal Supplements.** 6, p. F61–F67, 2004.

CAMPBELL, S. E., JANICKI, J. S., WEBER, K. T. Temporal differences in fibroblast proliferation and phenotype expression in response to chronic administration of angiotensin II or aldosterone. **J. Mol. Cell. Cardiol.** v. 27, p.1545-60, 1995.

CANNON, R. O 3rd; BUTANY, J. W; MCMANUS, B. M; SPEIR, E; KRAVITZ, A. B; BOLLI, R; FERRANS, V. J. Early. degradation of collagen after acute myocardial infarction in the rat. **Am J Cardiol.** v. 52, n. 3, p. 390-395, 1983.

CAREY, R. M. and SIRAGY, H. M. Newly recognized components of the reninangiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. **Endocr Rev.** v. 24, n. 3, p. 261-271, 2003.

COATES, D. The angiotensin converting enzyme (ACE). **Int J Biochem Cell Biol.** v. 35, n. 6, p. 769-773, 2003.

CHENG, W; KAJSTURA, J; NITAHARA, J. A; LI, B; REISS, K; LIU, Y; CLARK, W. A; KRAJEWSKI, S; REED, J. C; OLIVETTI, G; ANVERSA, P. Programmed myocyte cell death affects the viable myocardium after infarction in rats. **Exp Cell Res.** v. 226, n. 2, p. 316-327, 1996.

CHUNG, O; KÜHL, H; STALL, M; UNGER, T. Physiological and pharmacological implications of AT1 versus AT2 receptors. **Kidney Int Suppl.** v.67:S, p. 95-9, 1998.

CRACKOWER, M. A; SARAO, R; OUDIT, G. Y; YAGIL, C; KOZIERADZKI, I; SCANGA, S. E; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J; DA COSTA, J; ZHANG, L; PEI, Y; SCHOLEY, J; FERRARIO, C. M; MANOUKIAN, A. S; CHAPPELL, M. C; BACKX, P. H; YAGIL, Y; PENNINGER, J. M. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. **Nature.** v. 417, n. 6891, p. 822-828, 2002.

CRABOS, M; ROTH, M; HAHN, A. W. A; ERNE, P. Characterization of angiotensin II receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts. **J Clin Invest.** v. 93, p. 2372-2378, 1994.

CREEMERS, E. E; CLEUTJENS, J. P; SMITS, J. F; DAEMEN, M. J. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? **Circ Res.** v. 89, n. 3, p. 201-210, 2001.

DAHLÖF, B; DEVEREUX, R. B; KJELDSSEN, S. E; JULIUS, S; BEEVERS, G; DE, FAIRE. U; FYHRQUIST, F; IBSEN, H; KRISTIANSSON, K; LEDERBALLE-PEDERSEN, O; LINDHOLM, L. H; NIEMINEN, M. S; OMVIK, P; OPARIL, S; WEDEL, H. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomized trial against atenolol. **Lancet.** v.359, n. 9311, p. 995-1003, 2002.

DANSER, A. H; VAN KATS J. P; ADMIRAAL P. J, DERKX F. H; LAMERS J. M; VERDOUW P. D; SAXENA P. R; SCHALEKAMP M. A. Cardiac renin and angiotensins: Uptake from plasma versus in situ synthesis. **Hypertension.** v. 24, n. 1, p. 37-48, 1994.

DANILCZYK, U & PENNINGER, J. M. Angiotensin-converting enzyme II in the heart and the kidney. **Circ Res.** v. 98, n. 4, p. 463-471, 2006.

DAVIDOFF, A.W; BOYDEN, P. A; SCHWARTZ, K; MICHEL, J. B; ZHANG, Y. M; OBAYASHI, M; CRABBE, D; TER, KEUS. H. E. D. J. Congestive heart failure after myocardial infarction in the rat: cardiac force and spontaneous sarcomere activity. **New York Academy of Sciences.** v. 1015, p. 84-95, 2004.

DEAN, R. G; BALDING LC; CANDIDO, R; BURNS, W. C, CAO, Z, TWIGG, S. M; BURRELL, L. M. Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis after myocardial infarction. **J Histochem Cytochem.** v. 53, n. 10, p. 1245-1256, 2005.

DEFELICE, A; FRERING, R; HORAN, P. Time course of hemodynamic changes in rats with healed severe myocardial infarction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v. 257, n. 1 Pt 2, p. 289- 296, 1989.

DER SARKISSIAN, S; GROBE, J. L; YUAN, L; NARIELWALA, D. R; WALTER, G. A; KATOVICH, M. J; RAIZADA, M. K. Cardiac overexpression of angiotensin converting enzyme 2 protects the heart from ischemia-induced pathophysiology. **Hypertension,** v. 51, n. 3, p. 712–718, 2008.

DETEN, A; VOLZ, H. C; BRIEST, W; ZIMMER, H. G. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats. **Cardiovasc Res.** v. 55, n. 2, p. 329-340, 2002.

DETEN, A; HO'LZL, A; LEICHT, M; BARTH, W; ZIMMER, H. Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats. **Journal of molecular and cellular cardiology.** v. 33, n. 6, p. 1191–207, 2001.

DIAZ, A; BOURASSA, M. G; GUERTIN, M. C; TARDIF, J. C. Long-term prognostic value of resting heart rate in patients with suspected or proven coronary artery disease. **Eur Heartn J.** v. 26, n. 10, p. 967-974, 2005.

DONOGHUE M, HSIEH F, BARONAS E, GODBOUT K, GOSSELIN M, STAGLIANO N, DONOVAN M, WOOLF B, ROBISON K, JEYASEELAN R, BREITBART RE, ACTON S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circ Res.** v. 87, n. 5, p. E1-9, 2000.

DOSTAL, D. E & BAKER, K. M. The cardiac rennin-angiotensin system – conceptual, or a regulator of cardiac function? **Circ Res.** v. 85, n. 7, p. 643-50, 1999.

DU, X. J; COX, H. S; DART, A. M; ESLER, M. D. Sympathetic activation triggers ventricular arrhythmias in rat heart with chronic infarction and failure. **Cardiovasc Res.** v. 43, n. 4, p. 919-929, 1999.

EL-SABBAN, M. E; HASSAN, K. A; BIRBARI, A. E; BITAR, K. M, BIKHAZI, A. B. Angiotensin II binding and extracellular matrix remodelling in a rat model of myocardial infarction. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.** v. 1, n. 4, p. 369-378, 2000.

ERICKSON, B; SPERBER, K; FRISHMAN, W. H. Toll-like receptors: new therapeutic targets for the treatment of atherosclerosis, acute coronary syndrome, and myocardial failure. **Cardiol Ver.** v. 16, n. 6, p. 273-279, 2008.

FARIA, T. O; BALDO, M. P; SIMOES, M. R; PEREIRA, R. B; MILL, J. G; VASSALLO, D. V; STEFANON, I. Body weight loss after myocardial infarction in rats as a marker of early heart failure development. **Arch Med Res.** v. 42, n. 4, p. 274- 280, 2011.

FERGUSON, D. W; BERG, W. J, ROACH, P. J, OREN, R. M; MARK, A. L. Effects of heart failure on baroreflex control of sympathetic neural activity. **Am J Cardiol.** v. 69, n. 5, p. 523-531, 1992.

FERRARIO, C. M; JESSUP, J; CHAPPELL, M. C; AVERILL, D. B; BROSNIHAN, K. B; TALLANT, E. A; DIZ, D. I; GALLAGHER, P. E. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockers on cardiac angiotensin-converting enzyme 2. **Circulation.** v. 111, n. 20, p. 2605–2610, 2005.

FERREIRA, A. J; SANTOS, R. A; ALMEIDA, A. P. Angiotensin-(1-7) improves the post-ischemic function in isolated perfused rat hearts. **Braz J Med Biol Res,** v. 35, n. 9, p. 1083–1090, 2002.

FERREIRA, AJ; CASTRO, C. H; GUATIMOSIM, S; ALMEIDA, P. W; GOMES, E. R; DIAS-PEIXOTO, M. F; ALVES. M. N; FAGUNDES-MOURA, C. R; RENTZSCH, B; GAVA, E; ALMEIDA, A. P; GUIMARÃES, A. M; KITTEN, G. T; REUDELHUBER, T; BADER, M; SANTOS, R. A. Attenuation of isoproterenol-induced cardiac fibrosis in transgenic rats harboring an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in the heart. **Ther Adv Cardiovasc Dis,** v. 4, n. 2, p. 83–96, 2010.

FISHBEIN, M. C; MACLEAN, M. B; MAROKO, P. R. Experimental myocardial infarction in the rat. Qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. **Am J Pathol.** v. 90, n. 1, p. 57-70, 1978.

FLETCHER, P. J; FLETCHER, P. J; PFEFFER, J. M; PFEFFER, M. A; BRAUNWALD, E. Left ventricular diastolic pressure-volume relations in rats with healed myocardial infarction. Effects on systolic function. **Circ Res.** v. 49, n. 3, p. 618-26, 1981.

FRANGOIANNIS, N. G & ENTMAN, M. L. Chemokines in myocardial ischemia. **Trends Cardiovasc Med.** v. 15, n. 5, p. 163-169, 2005.

FRANGOIANNIS, N. G. The mechanistic basis of infarct healing. **Antioxid Redx Signal.** v. 8, n. 11-12, p. 1907-1939, 2006.

FRANGOIANNIS, N. G. The immune system and cardiac repair. **Pharmacol Res.** v. 58, n. 2, p. 88-111, 2008.

FYHRQUIST F & SAJONMAA O. Renin-angiotensin system revisited. **J Intern Med.** v. 264, n. 3, p. 224-36, 2008.

GRIEDLING, K. K; RITTENHOUSE, S. E; BROCK, T. A; EKSTEIN, L. S; GIMBRONE, M. A; ALEXANDER, R. W. Sustained diacylglycerol formation from inositol phospholipids in angiotensin II-stimulated vascular muscle cells. **J Biol Chem.** v. 261, n. 13, p. 5901-5906, 1986.

GRIEDLING, K. K; MURPHY, T. J; ALEXANDER, R. W. Molecular biology of the renin-angiotensin system. **Circulation.** v. 87, n. 6, p. 1816-28, 1993.

HARRISON, D. G; SORESCU, D; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H Oxidase: Role in Cardiovascular Biology and Disease. **Circ Res.** v. 86, n. 4, p.494-501, 2000.

HERINGER-WALTHER, S; ECKERT, K; SCHUMACHER, S. M; UHAREK, L; WULF-A; GEMBARDT, F; FICHTNER, I; SCHULTHEISS, H. P; RODGERS, K; WALTHER, T. Angiotensin-(1-7) stimulates hematopoietic progenitor cells *in vitro* and *in vivo*. **Haematologica.** v. 94, n. 6, p. 857–860, 2009.

HILL, M. F & SINGAL, P. K. Antioxidant and Oxidative Stress Changes during Heart Failure Subsequent to Myocardial Infarction in Rats. **American journal of Pathology.** v. 148, n.1, p. 291–300, 1996.

HOMEIDA, A. M; EL, AMIN. E. A; ADAM, S. E; MAHMOUD, M. M. Toxicity of diminazeneaceturate (Berenil) to camels. **J Comp Pathol.** v. 91, n. 3, p. 355–360, 1981.

Hu, K; Gaudron, P; Anders, H. J; Weidemann, F; Turschner, O; Nahrendorf, M; Ertl, G. Chronic effects of early started angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin AT1-receptor subtype blockade in rats with myocardial infarction: role of bradykinin. **Cardiovasc Res.** v. 39, n. 2, p. 401-412, 1998.

HUANG, B. S & LEENEN, F. H. H. Blockade of brain mineralocorticoid receptors or Na⁺ channels prevents sympathetic hyperactivity and improves cardiac function in rats post-MI. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v. 288; n. 5, p. 2491-2497, 2005.

HUANG, B. S; AHMAD, M; TAN, J; LEENEN, F. H. H. Chronic central versus systemic blockade of AT1 receptors and cardiac dysfunction in rats post-myocardial infarction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v. 297, n. 3, p. 968-975, 2009.

IWAMI, K; ASHIZAWA, N; DO, Y. S; GRAF, K; HSUEH, W. A. Comparison of ANG II with other growth factors on Egr-1 and matrix gene expression in cardiac fibroblasts. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v. 270, n. 6 Pt 2, p. 2100-2107, 1996.

JIANG, L; HUANG, Y; HUNYOR, S; DOS, REMEDIOS. C. G. Cardiomyocyte apoptosis is associated with increased wall stress in chronic failing left ventricle. **Eur Heart J.** v. 24, n. 8, p. 742-751, 2003.

JIANG, B & LIAO, R. The paradoxical role of inflammation in cardiac repair and regeneration. **J Cardiovasc Transl Res.** v. 3, n. 4, p. 410-6, 2010.

JOHNS, T. N. P & OLSON, B. J. Experimental myocardial infarction. A method of coronary occlusion in small animals. **Ann Surg.** v. 140, n. 5, p. 675-682, 1954.

JU, H; ZHAO, S; JASSAL, D. S; DIXON, I. M. Effect of AT1 receptor blockade on cardiac collagen remodeling after myocardial infarction. **Cardiovasc Res.** v. 35, n. 2, p. 223-232, 1997.

JUGDUTT, B. I; IDIKIO, H; UWIERA, R. R. E. Therapeutic drugs during healing after myocardial infarction modify infarct collagens and ventricular distensibility at elevated pressures. **Mol Cell Biochem.** v. 304, n. 1-2, p. 79-91, 2007.

KABOUR, A., HENEGAR, J. R., JANICKI, S. Angiotensin II (AII)-induced myocyte necrosis: role of the AII receptor. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** v.23, p.547-53, 1994

KANESHIRO, Y; ICHIHARA, A; SAKODA, M; TAKEMITSU, T; NABI, A. H; UDDIN, M. N; NAKAGAWA, T; NISHIYAMA, A; SUZUKI, F; INAGAMI, T; ITOH, H. Slowly progressive, angiotensin II-independent glomerulosclerosis in human (pro)renin receptor-transgenic rats. **J Am Soc Nephrol.** v. 18, n. 6, p. 1789-1795, 2007.

KULEMINA, L. V & OSTROV, D. A. Prediction of Off-Target Effects on Angiotensin-Converting Enzyme 2. **Journal of Biomolecular Screening.** v. 16, n. 8, p. 878-885, 2011.

KRIEGER, J. E. Bases moleculares das doenças cardiovasculares- A integração entre a pesquisa e a pratica clinica. São Paulo. Atheneu. 2008

LAMBERT, J. M; LOPEZ, E. F; LINDSEY, M. L. Macrophage roles following myocardial infarction. **Int J Cardiol.** v. 130, n. 2, p. 147-158, 2008.

LEE, T. M; LIN, M. S; CHANG, N. C. Inhibition of histone deacetylase on ventricular remodeling in infarcted rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v. 293, n. 2, p. 968-977, 2007.

LEITE, C. M; GOMES, M. G; VASSALLO, D. V; MILL, J. G. Changes in collagen content in the residual myocardium surviving after infarction in rats. Influence of propranolol or

hydralazine therapy. **Arch Med Res.** v. 26, n. 1, p. 79-84, 1995.

LOOT, A. E; ROKS, A. J; HENNING, R. H; TIO, R. A; SUURMEIJER, A. J; BOOMSMA, F; VAN, GILST, W. H. Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. **Circulation**, v. 105, n. 13, p. 1548–1550, 2002.

LORELL, B. H. Role of angiotensin AT(1) and AT(2) receptors in cardiac hypertrophy and disease. **Am J Cardiol.** v. 83, n. 12A, p. 48H-52H, 1999.

MACHACKOVA J SANGANALMATH SK, BARTA J, DHALLA KS, DHALLA NS. Amelioration of cardiac remodeling in congestive heart failure by beta-adrenoceptor blockade is associated with depression in sympathetic activity. **Cardiovasc Toxicol.** v. 10, n. 1, p. 9-16, 2010.

MARANO, G; PALAZZESI, S; FADDA, A; VERGARI, A; FERRAI, A. U. Attenuation of aortic banding-induced cardiac hypertrophy by propranolol is independent of beta-adrenoceptor blockade. **J Hypertens.** v. 20, n. 4, p. 763-769, 2002.

NEDELJKOVIC, Z. S; GOKCE, N; LOSCALZO, J. Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction. **Postgrad Med.** v. 79, n. 930, p. 195–200, 2003.

MEHTA, P & GRIENDLING, K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. **Am J Physiol Cell Physiol.** v. 292, p. C82–C97, 2007.

MILL, J. G; STEFANON, I; LEITE, C. M; VASSALLO, D. V. Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. **Cardiovasc Res.** v. 24, n. 9, p. 748-753, 1990.

MILL, J. G; VASSALLO, D. V; LEITE, C. M. Time course of changes in heart rate and sympathetic tone after coronary artery ligation in rats. **Braz J Med Biol Res.** v. 24, n. 8, p. 855-858, 1991.

MILL, J. G; GOMES, A. P; CARRARA, A. B; GOMES, M. G; VASSALLO, D. V. Influence of chronic captopril therapy on the mechanical performance of the infarcted rat heart. **Pharmacol Res.** v.29, n.1, p.77-88, 1994.

MILL, J. G; MILANEZ, M. D. A. C; BUSATTO, V. C; DE, MORAES. A. C; GOMES, M. D. A. G. Activation of the cardiac angiotensin-converting enzyme after myocardial infarction and its role in ventricular remodeling. **Arq Bras Cardiol.** v. 69, n. 6, p. 101-110, 1997.

MILL, J. G; MILANEZ, M. C; VILLARREAL, M. M; GOMES, M. G. S; LEITE, C. M. Spironolactone prevents cardiac collagen proliferation after myocardial infarction in rats. Clin Experim. **Pharmacol Physiol.** v. 30, n. 10, p. 739-744, 2003.

MORO, C; JOUAN, M. G; RAKOTOVAO, A; TOUFEKTSIAN, M. C; ORMEZZANO, O; NAGY, N; TOSAKI, A; DE, LEIRIS. J; BOUCHER, F. Delayed expression of cytokines after reperfused myocardial infarction: possible trigger for cardiac dysfunction and ventricular remodeling. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v. 293, n. 5, p. 3014-3019, 2007.

MULDER, P; DEVAUX, B; RICHARD, V; HENRY, J. P; WIMART, M. C; THIBOUT, E; MACÉ, B; THUILLEZ, C. Early versus delayed angiotensin converting enzyme inhibition in experimental chronic heart failure - Effects on survival, hemodynamics, and cardiovascular remodeling. **Circulation**. v. 95, n. 5, p. 1314-1319, 1997.

MULROW, P. J. Angiotensin II and aldosterone regulation. **Regulatory peptides**. v. 80, n. 1-2, p. 27-32, 1999.

MURRAY, D. R; PRABHU, S. D; CHANDRASEKAR, B. Chronic β -adrenergic stimulation induces myocardial proinflammatory cytokine expression. **Circulation**. v. 101, n. 20, p. 2338-2341, 2000.

NAHRENDORF, M; HU K; FRACCAROLLO, D; HILLER K, H; HAASE, A; BAUER, W. R; ERTL, G. Time course of right ventricular remodeling in rats with experimental myocardial infarction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v. 284, n. 1, p. H241-H248, 2003.

NEDELJKOVIC, Z. S; GOKCE, N; LOSCALZO, J. Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction. **Postgrad Med**. v. 79, n. 930, p. 195-200, 2003.

NIAN, M; LEE, P; KHAPER, N; LIU, P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. **Circulation research**. v. 94, n. 12, p. 1543-53, 2004.

NIO, Y; MATSUBARA, H; MURASAWA, S; KANASAKI, M; INADA, M. Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction. **J Clin Invest**. v. 95, n. 1, p. 46-54, 1995.

NIJLAND, F; KAMP, O; VERHORST PMJ, DE VOOGT WG; BOSCH, H. G; VISSER, C. A. Myocardial viability: impact on left ventricular dilatation after acute myocardial infarction. **Heart**. v. 87, n. 1, p. 17-22, 2002.

NORMAN, T. D & COERS, C. R. Cardiac hypertrophy after coronary artery ligation in rats. **Arch Pathol**. v. 69, p. 181-184, 1960.

NORRIS, R. M; CROSS, D. B; WILD, C. J; WHITLOCK, R. M. L. Prognosis after recovery from myocardial infarction: the relative importance of cardiac dilatation and coronary stenoses. **Eur Heart J**. v. 13, n. 12, p. 1611-1618, 1992.

NGUYEN, G & DANSER, A. H. Prorenin and (pro)renin receptor: A review of available data from in vitro studies and experimental models in rodents. **Exp Physiol**. v. 93, n. 5, p. 557-563, 2008.

OUDIT, G. Y; CRACKOWER, M. A; BACKX P. H; PENNINGER, J. M. The role of ACE2 in cardiovascular physiology. **Trends Cardiovasc Med**. v. 13, n. 3, p. 93- 101, 2003.

OUDIT, G. Y & KASSIRI, Z. Role of PI3 kinase gamma in excitation-contraction coupling and heart disease. **Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets**, v. 7, n. 4, p. 295-304, 2007.

OCARANZA, M. P; LAVANDERO, S; JALIL, J. E; MOYA, J; PINTO, M; NOVOA, U; APABLAZA, F; GONZALEZ, L; HERNANDEZ, C; VARAS, M; LOPEZ, R; GODOY, I; VERDEJO, H; CHIONG, M. Angiotensin-(1-9) regulates cardiac hypertrophy in vivo and in vitro. **J Hypertens**. v. 28, n. 5, p. 1054-1064, 2010.

OLIVETTI, G; CAPASSO, J.M; SONNENBLICK, E. H; ANVERSA, P. Side-to-side slippage of myocytes participates in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rats. **Circ Res.** v. 67, n. 1, p. 23-34, 1990.

Organização Mundial da Saúde(OMS). *Disponível em www.who.int/countries. 2011*

Paula, R. D; Lima, C. V; Khosla, M. C; Santos, R. A. Angiotensin-(17) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. **Hypertension.** v. 26, n. 6Pt 2, p. 1154-1159, 1995.

PAUL, M; POYAN, MEHR. A; KREUTZ, R. Physiology of local renin angiotensin systems. **Physiol Rev.** v. 86, n. 3, p. 747-803, 2006.

PAUL, S. Ventricular remodeling. **Crit Care Nurs Clin North Am,** v. 15, n. 4, p. 407-11, 2003.

PALJOJOKI, E; SARASTE, A; ERIKSSON, A; PULKKI, K; KALLAJOKI, M; VOIPIO-PULKKI, L. M; TIKKANEN, I. Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v. 280, n. 6, p. 2726-2731, 2001.

PARADIS, P; DALI-YOUCHEF, N; PARADIS, F. W; THIBAUT, G; NEMER, M. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. **Proc Natl Acad Sci.** v. 97, n. 2, p. 931-936, 2000.

PEREIRA, R. B; SARTORIO, C. L; VASSALLO, D. V; STEFANON, I. Differences in tail vascular bed reactivity in rats with and without heart failure following myocardial infarction. **J Pharmacol and Experimental Therapeutics.** v. 312, n. 3, p. 1321-1325, 2005.

PERRINO, C; SCHRODER, J. N; LIMA, B; VILLAMIZAR, N; NIENABER, J. J; MILANO, CA; NAGA, PRASAD. S. V. Dynamic regulation of phosphoinositide 3-kinase-gamma activity and betaadrenergic receptor trafficking in end-stage human heart failure. **Circulation.** v. 116, n. 22, p. 2571-2579, 2007.

PILCH, D. S; KIROLOS, M. A; LIU, X; PLUM, G. E; BRESLAUER, K. J. Berenil [1,3-bis(4'-amidinophenyl)triazene] binding to DNA duplexes and to a RNA duplex: evidence for both intercalative and minor groove binding properties. **Biochemistry.** v. 34, n.31, p. 9962–9976, 1995.

PFEFFER, M. A; PFEFFER, J.M; FISHBEIN, M; FLETCHER, P. J; SPADARO, J; KLONER, R. A; BRAUNWALD, E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. **Circ Res.** v. 44, n. 4, p. 503-512, 1979.

PFEFFER, M. A; PFEFFER, J. M; STEINBERG, C; FINN, P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. **Circulation.** v. 72, n. 2, 406-412, 1985.

PFEFFER, M. A & BRAUNWALD, E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. **Circulation.** v. 81, n. 4, p. 1161-1172, 1990.

PRABHU, S. D; WANG, G; LUO, J; GU, Y; PING, P; CHANDRASEKAR, B. β -Adrenergic receptor blockade modulates Bcl-xS expression and reduces apoptosis in failing myocardium. **J Mol Cel Cardiol.** v. 35, n. 5, p. 483-493, 2003.

RESENDE, M. M; KAUSER, K; MILL, J. G. Regulation of cardiac and renal mineralocorticoid receptor expression by captopril following myocardial infarction in rats. **Life Sci.** v. 78, n. 26, p. 3066-3073, 2006.

RESENDE, M. M & MILL, J. G. Effect of high salt intake on local renin-angiotensin system and ventricular dysfunction following myocardial infarction in rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** v. 34, n. 4, p. 274-279, 2007.

RIGATTO, K; CASALI, K. R; SHENOY, V; KATOVICH, M. J; RAIZADA, M. K. Diminazene aceturate improves autonomic modulation in pulmonary hypertension. **Eur J Pharmacol.** v. 13, n. 1-3, p. 89-93, 2013

RICHER-GIUDICELLI, C; FORNES, P; CAZAUBON, C; NISATO, D; GIUDICELLI, J. F. Effects of angiotensin II AT1 receptor blockade on survival, systemic and coronary hemodynamics and cardiac remodeling in postischemic heart failure in rats. **Circulation.** v. 96(suppl), p. 3605, 1997.

ROBERT, V; HEYMES, C; SILVESTRE, J; SABRI, A; SWYNGHEDAUW, B; DELCAYRE, C. Angiotensin AT1 Receptor Subtype as a Cardiac Target of Aldosterone : Role in Aldosterone-Salt Induced Fibrosis. **Hypertension.** v. 33, n. 4, p. 981–986, 1999.

ROBINSON, T. F; GERACI, M. A; SONNENBLICK, E. H; FACTOR, S. M. Coiled perimysial fibers of papillary muscle in rat heart: morphology, distribution, and changes in configuration. **Circ Res.** v. 63, n. 3, p. 577-592, 1988.

ROHDE, L. E; DUCHARME, A; ARROYO, L. H; AIKAWA, M; SUKHOVA, G. H; LOPEZ-ANAYA, A; MCCLURE, K. F; MITCHELL, P. G; LIBBY, P; LEE, R. T. Matrix Metalloproteinase Inhibition Attenuates Early Left Ventricular Enlargement After Experimental Myocardial Infarction in Mice. **Circulation.** v. 99, n. 23, p. 3063–3070, 1999.

RUBIN, EMANUEL et al. Rubin patologia: bases clinicopatológicas da Medicina. 4. ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, c2006.

SADOSHIMA, J & IZUMO, S. Mechanotransduction in Stretch-Induced Hypertrophy of Cardiac Myocytes. **J Recept Res.** v. 13, p. 1-4, p. 777-794, 1993.

SAITO, T; RODGER, I. W; SHENNIB, H; HU, F; TAYARA, L; GIAID, A. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in acute myocardial infarction: cellular expression and use of selective COX-2 inhibitor. **Can J Physiol Pharmacol.** v. 81, n. 2, p. 114-119, 2003.

SANTOS, A. A; HELBER, I; FLUMIGNAN, R. L; ANTONIO, E. L; CARVALHO, A. C; PAOLA, A. A; TUCCI, P. J; MOISES, V. A. Doppler echocardiographic predictors of mortality in female rats after myocardial infarction. **J Card Fail.** v. 15, n. 2, p. 163-168, 2009.

SANTOS, R. A; FERREIRA, A. J; SIMÕES, E. S. A. C. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. **Exp physiol.** v. 93, n. 5, p. 519-527, 2008.

SANTOS, R. A.S; BROSNIHAN. K. B; CHAPPELL, M. C; PESQUERO, J. L; CHERNICKY, C. L; GREENE, L. J; FERRARIO, C. M. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension.* v. 11, n. 2 Pt 2, p. 153-157, 1988.

SANTOS, R. A; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J; ANDRADE, S. P. Angiotensin(1-7): an update. **Regul Pept.** v. 91, n. 1-3, p. 45-62, 2000.

SARAIVA, R. M; KANASHIRO-TAKEUCHI, R. M; ANTONIO, E. L; CAMPOS, O; TUCCI, P. J. F; MOISES, V. A. Rats with high left ventricular end-diastolic pressure can be identified by Doppler echocardiography one week after myocardial infarction. **Braz J Med Biol Res.** v. 40, n. 11, p. 1557-1565, 2007.

SARTORIO, C. L; PINTO, V. D; CUTINI, G. J. S, VASSALLO, D. V, STEFANON, I. Effects of inducible nitric oxide synthase inhibition on the rat tail vascular bed reactivity three days after myocardium infarction. **J Cardiovasc Pharmacol.** v. 45, n. 4, p. 321-326, 2005.

SIMONIS, G; WIEDEMANN, S; SCHWARZ, K; CHRIST, T; SEDDING, D. G; YU, X; MARQUETANT, R; BRAUN-DULLAEUS, R. C; RAVENS, U; STRASER, R. H. Chelerythrine treatment influences the balance of pro- and anti-apoptotic signaling pathways in the remote myocardium after infarction. **Mol Cell Biochem.** v. 310, n. 1-2, p. 119-128, 2008.

SOHN, H. J; YOO, K. H; JANG, G. Y; LEE, J. H; CHOI, B. M; LEE, J. H; BAE, I. S; YIM, H. E; SON, C. S; LEE, J. W. Aldosterone modulates cell proliferation and apoptosis in the neonatal rat heart. **Journal of Korean medical Science.** v. 25, n. 9, p. 1296–304, 2010.

SUN, Y & WEBER, K. T. Angiotensin II receptor binding following myocardial infarction in the rat. **Cardiovasc Res.** v. 28, n. 11, p. 1623-1628, 1994.

SUN, Y; RATAJSKA, A; WEBER, K. T. Inhibition of angiotensin-converting enzyme and attenuation of myocardial fibrosis by lisinopril in rats receiving angiotensin II. **J Lab Clin Med.** v. 126, n. 1, p. 95-101, 1995.

SUN, Y & WEBER, K. T. Angiotensin converting enzyme and myofibroblasts during tissue repair in the rat heart. **J Mol Cell Cardiol.** v. 28, p. 851-858, 1996.

SUN, Y & WEBER, K. T. Infarct scar: a dynamic tissue. **Cardiovascular Research.** v. 46, n. 2, p. 250–256, 2000.

SUN, Y; ZHANG, J; ZHANG, J; WEBER, K. T. Renin expression at sites of repair in the infarcted rat heart. **Journal of molecular and cellular cardiology.** v. 33, n. 5, p. 995–1003, 2001.

SUMIT, K; LIE, G; IRVING, Z. Exercise training normalizes ACE and ACE2 in the brain of rabbits with pacing-induced heart failure. **J Appl Physiol.** v. 108, n. 4, p. 923–932, 2010.

SUZUKI, Y; RUIZ-ORTEGA, M; LORENZO, O; RUPEREZ, M; ESTEBAN, V; EGIDO, J. Inflammation and angiotensin II. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 35, n.6, p.881-900, 2003.

SCHIEFFER, B; WIRGER, A; MEYBRUNN, M; SEITZ, S; HOLTZ, J; RIEDE, U. N; DREXLER, H. Comparative effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade on cardiac remodeling after myocardial infarction in the rat. **Circulation**. v.89, n.5, p.2273-2282, 1994.

SCHWARZ K, SIMONI. G; YU X, WIEDEMANN. S; STRASSER, R. H. Apoptosis at a distance: remote activation of caspase-3 occurs early after myocardial infarction. **Mol Cell Biochem**. v. 281, n. 1-2, p. 45-54, 2006.

SCHIEFER, B; WIRGER, A; MEYBRUNN, M; SEITZ, S; HOLTZ, J; RIEDE, U. N; DREXLER, H. Comparative effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade on cardiac remodeling after myocardial infarction in the rat. **Circulation**. v. 89, n. 5, p. 2273- 2282, 1994.

SHARMA, S. P & BANSAL, G. C. Chemoprophylaxis with diminazene aceturate in experimental Babesia bigemina infection in cattle. **Res Vet Sci**. v. 37, n. 1, p. 126–127, 1984.

SHENOY V, FERREIRA AJ, QI Y, FRAGA-SILVA RA, DIEZ-FREIRE C, DOOIES A, JUN JY, SRIRAMULA S, MARIAPPAN N, POURANG D, VENUGOPAL CS, FRANCIS J, REUDELHUBER T, SANTOS RA, PATEL JM, RAIZADA MK, KATOVICH MJ. The ACE2/Ang-(1–7)/Mas axis confers cardiopulmonary protection against lung fibrosis and pulmonary hypertension. **Am J Respir Crit Care Med**. v. 182, n. 8, p.1065–1072, 2010.

SHENOY, V; GJYMISHKA, A; JARAJAPU, Y. P; QI, Y; AFZAL, A; RIGATTO, K; FERREIRA, A. J; FRAGA-SILVA, R. A; KEARNS, P; DOUGLAS, J. Y; AGARWAL, D; MUBARAK, K. K; BRADFORD, C; KENNEDY, W. R; JUN, J. Y; RATHINASABAPATHY, A; BRUCE, E; GUPTA, D; CARDOUNEL, A. J; MOCCO, J; PATEL, J. M; GRANT, M. B; KATOVICH, M. J; RAIZADA, M. K. Diminazene attenuates pulmonary hypertension and improves angiogenic progenitor cell functions in experimental models. **Am J Respir Crit Care Med**. v. 187, n. 6, p. 648–657, 2013.

SPINALE, F. G; ESCOBAR, G. P; HENDRICK, J. W; CLARK, L. L; CAMENS, S. S; MINGOIA, J. P; SQUIRES, C. G; STROUD, R. E; IKONOMIDIS, J. S. Chronic matrix metalloproteinase inhibition following myocardial infarction in mice: differential effects on short and long-term survival. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 318, n. 3, p. 966-973, 2006.

STEFANON, I. et al. Left and right ventricle late remodeling following myocardial infarction in rats. **PLoS One**. v. 8, n. 5, p. e64986, 2013.

TAN, S. M; ZHANG, Y; CONNELLY, K. A; GILBERT, R. E; KELLY, D. J. Targeted inhibition of activin-receptor-like kinase 5 signaling attenuates cardiac dysfunction following myocardial infarction. **Am J Physiol Heart CircPhysiol**. v. 298, n. 5, p. 1415-1425, 2010.

TAYLOR, K; PATTEN, R. D; SMITH, J. J. Divergent effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II-receptor antagonism on myocardial cellular

proliferation on collagen disposition after myocardial infarction in rats. **J Cardiovasc Pharmacol.** v. 31, p. 654-60, 1998.

TESTA, M; YEH, M; LEE, P; FANELLI, R; LOPERFIDO, F; BERMAN, J. W; LEJEMTEL, T. H. Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. **J Am Coll Cardiol.** v. 28, n. 4, p. 964-971, 1996.

TORRE-AMIONE, G; KAPADIA, S; BENEDICT, C; ORAL, H; YOUNG, J. B; MANN, D. L. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular (SOLVD). **J Am Coll Cardiol.** v. 27, n. 5, p. 1201-1206, 1996.

TRIPOSKIADIS, F; KARAYANNIS, G; GIAMOUZIS, G; SKOULARIGIS, J; LOURIDAS, G; BUTLER, J. The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. **J Am Coll Cardiol.** v. 54, n. 19, p. 1747-1762, 2009.

TSCHOPE, C; SCHULTHEISS, H. P; WALTHER, T. Multiple Interactions between the Renin-Angiotensin and the Kallikrein-Kinin Systems: Role of Ace Inhibition and At1 Receptor Blockade. **J Cardiovasc Pharmacol.** v. 39, n. 4, p. 478-487, 2002.

UNGER, T; CHUNG, O; CSIKOS, T.; et al. Angiotensin receptors. **J Hypertens.** v.14, p. S95-S103, 1996.

VALEUR, H. S & VALEN, G. Innate immunity and myocardial adaptation to ischemia. **Basic Res Cardiol.** v. 104, n. 1, p. 22-32, 2009.

VANDERVELDE, S; VAN LUYN, M. J. A; ROZENBAUM, M. H; PETERSEN, A. H; TIO, R.A; HARMSSEN, M. C. Stem cell-related cardiac gene expression early after murine myocardial infarction. **Cardiovasc Res.** v. 73, n. 4, p. 783-793, 2007.

VANHOUTTE, D; SCHELLINGS, M; PINTO, Y; HEYMANS, S. Relevance of matrixmetalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal andspatial window. **Cardiovasc Res.** v. 69, n. 3, p. 604-613, 2006.

VARAGIC, J; TRASK, A. J; JESSUP, J. Á; CHAPPELL, M. C; FERRARIO, C. M. New angiotensins. **J Mol med (Berl).** v. 86, n. 6, p. 663-671, 2008.

VILAHUR, G; JUAN-BABOT, O; PEÑA, E; OÑATE, B; CASANÍ, L; BADIMON, L. Molecular and cellular mechanisms involved in cardiac remodeling after acute myocardial infarction. **J Mol Cell Cardiol.** v. 50, n. 3, p. 522-533, 2011.

VINAYAK SHENOY; ALTIN GJYMISHKA; YAGNA, P. JARAJAPU et al. Diminazene Attenuates Pulmonary Hypertension and Improves Angiogenic Progenitor Cell Functions in Experimental Models. the American Thoracic Society. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 187, n. 6, p. 648-657, 2013.

VIRDIS, A; DURANTI, E; TADDE, S. Oxidative Stress and Vascular Damage in Hypertension : Role of Angiotensin II. **International Journal of Hypertension**. p. 7, 2011. ID 916310

VOELKEL, N. F; QUAIFE, R. A; LEINWAND, L. A; BARST, R. J; MCGOON, M. D; MELDRUM, D. R; DUPUIS, J; LONG, C. S; RUBIN, L.J; SMART, F.W; SUZUKI, Y.J; GLADWIN, M; DENHOLM, E. M; GAIL, D. B. Right Ventricular Function and Failure: Report of a National Heart, Lung, and Blood Institute Working Group on Cellular and Molecular Mechanisms of Right Heart Failure. **Circulation**. v. 114, n. 17, p.1883-1891, 2006.

WANG₁ X; YE₁ Y; GONG₁ H; WU₁ J; YUAN₁ J; WANG₁ S; YIN₁ P; DING₁ Z; KANG₁ L; JIANG₁ Q; ZHANG₁ W; LI₁ Y; GE₁ J; ZOU₁ Y. The effects of different angiotensin II type 1 receptor blockers on the regulation of the ACE-AngII-AT1 and ACE2-Ang(1-7)-Mas axes in pressure overload-induced cardiac remodeling in male mice. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. v. 19, n. 97, p. 180-190, 2016.

WANG, Y; QIAN, C; ROKS, A. J; WESTERMANN, D; SCHUMACHER, S. M; ESCHER, F; SCHOEMAKER, R. G; REUDELHUBER, T. L; VAN, GILST. W. H; SCHULTHEISS, H. P; TSCHÖPE, C; WALTHER, T. Circulating rather than cardiac angiotensin-(1-7) stimulates cardioprotection after myocardial infarction. **Circ Heart Fail**. v. 3, p. 286–293, 2010.

WILKE, A; FUNCK, R; RUPP, H; BRILLA, C. G. Effect of the renin-angiotensin-aldosterone system on the cardiac interstitium in heart failure. **Basic Res Cardiol**. v. 91, n.2, p. 79-84, 1996.

WOOD, J. M; MAIBAUM, J; RAHUEL, J; GRÜTTER, M. G; COHEN, N. C; RASETTI, V; RÜGER, H; GÖSCHKE, R; STUTZ, S; FUHRER, W; SCHILLING, W; RIGOLLIER, P; YAMAGUCHI, Y; CUMIN, F; BAUM, H. P; SCHNELL, C. R; HEROLD, P; MAH, R; JENSEN, C; O'BRIEN, E; STANTON, A; BEDIGIAN, M. P. Structure-based design of Aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 308, n. 4, p. 608-705, 2003.

WHITTAKER, P; BOUGHNER, D.R; KLONER, R. A. Role of collagen in acute myocardial infarction expansion. **Circulation**. v. 84, n. 5, p. 2123-2134, 1991.

XU, J; CARRETERO, O. A; LIN, C. X; CAVASIN, M. A; SHESELY, E. G; YANG, J. J; REUDELHUBER, T. L; YANG, X. P. Role of cardiac overexpression of ANG II in the regulation of cardiac function and remodeling postmyocardial infarction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v. 293, n. 3, p. 1900-1907, 2007.

YAMAGISHI, H; KIM, S; NISHIKIMI, T; TAKEUCHI, K; TAKEDA, T. Contribution of cardiac renin-angiotensin system to ventricular remodeling in myocardial-infarcted rats. **J Mol Cell Cardiol**. v. 25, n. 11, p. 1369-1380, 1993.

YAMAMOTO, K; Ohishi₁ M; Katsuya₁ T; Ito₁ N; Ikushima₁ M; Kaibe₁ M; Tataru₁ Y; Shiota₁ A; Sugano₁ S; Takeda₁ S; Rakugi₁ H; Ogihara₁ T. Deletion of angiotensin-converting enzyme 2 accelerates pressure overload-induced cardiac dysfunction by increasing local angiotensin II. **Hypertension**, v. 47, n. 4, p. 718–726, 2006.

YANFEI, QI; JUAN, Z; COLLEEN, T; COLE-JEFFREY, V. Y. S; ANDREW, E; MINA, H; CHUNJUAN, S; CARL, J. P; MICHAEL, J. K; MOHAN, K. R. L. DiminazeneAceturate Enhances Angiotensin-Converting Enzyme 2 Activity and Attenuates Ischemia-Induced. **Hypertension**. v. 62, n. 4, p. 746-752, 2013.

YANG, F; LIU, Y. H; YANG, X. P; KAPKE, A; CARRETERO, O. A. Myocardial infarction and cardiac remodeling in mice. **Exp Physiol**. v. 87; n. 3, p. 547-555, 2002.

ZORNOFF, L. A. M; PAIVA, S. A. R; MINICUCCI, M. F; SPADARO, J. Experimental Myocardium Infarction in Rats: Analysis of the Model. **Arq Bras Cardiol**. v. 93, n. 3, p. 403-408, 2008.

ZORNOFF, L. A; PAIVA, S. A; MATSUBARA, B. B; MATSUBARA, L. S; SPADARO, J. Combination therapy with angiotensin converting enzyme inhibition and AT1 receptor inhibitor on ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. **J Cardiovasc Pharmacol Ther**. v. 5, n. 3, p. 203-209, 2000.

ZHAO, Y. X; YIN, H. Q; YU, Q. T; QIAO, Y; DAI, H. Y; ZHANG, M. X; ZHANG, L; LIU, Y. F; WANG, L. C; LIU, D. S; DENG, B. P; ZHANG, Y. H; PAN, C. M; SONG, H. D; QU, X; JIANG, H; LIU, C. X; LU, X. T; LIU, B; GAO, F; DONG, B. ACE2 overexpression ameliorates left ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of myocardial infarction. **Hum Gene Ther**, v. 21, n. 11, p. 1545–1554, 2010.